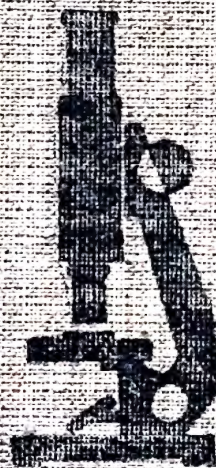


E. Onei
Virginia Constantinescu

**Diagnosticul de laborator
în medicina veterinară**



EMIL ONET
Doctor în medicină
veterinară

VIRGINIA CONSTANTINESCU
Doctor în medicină
veterinară

619
0-55

Diagnosticul de laborator în medicina veterinară



Cuprins

Introducere	11
Protecția muncii în lucrările de laborator	15
Sterilizarea și dezinfectia	18
Sterilizarea prin agenți fizici	18
Sterilizarea prin agenți chimici	26
Tehnica recoltării, ambalării și transportului materialelor patologice pentru examenul de laborator	27
Examenul microscopic	32
Tehnica efectuării frotiurilor	35
Metodele cele mai importante de colorare pentru examenul bacterioscopic	36
Determinarea dimensiunilor bacteriilor	42
Examenul bacteriologic	43
Mediile de cultură folosite pentru izolarea diferitelor tipuri de bacterii	49
Examenul caracterelor culturale	63
Examinarea caracterelor metabolice (biochimice) ale germenilor bacterieni	66
Reacții de punere în evidență a capacității zaharolitice (fermentarea zaharurilor)	66
Reacții prin care se pune în evidență existența fermenților activi față de substanțele proteice și aminoacizi și existența unor produși rezultați din dezințegrarea substanțelor proteice	68
Reacții prin care se pun în evidență fermenții oxido-reductori	72
Reacții care urmăresc punerea în evidență a folosirii ca sursă de hrană a unor substraturi conținute în mediu	74
Teste speciale folosite în identificarea micobacteriilor	74
Determinarea sensibilității germenilor față de substanțe antibiotice și chimioterapeutice	78
Determinarea sensibilității față de antibiotice (antibiograma)	84
Determinarea acțiunii antibacteriene a substanțelor antiseptice și dezinfectante	86
Determinarea capacității de elaborare a unor toxine bacteriene	87
Testarea patogenității germenilor bacterieni pentru animalele de experiență	94
— Determinarea dozei minime letale (DLM)	97
Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs	99
Obținerea bacteriocinelor	101
Prepararea bacterinelor	103
Examele serologice ca metode de decelare a infecțiilor bacteriene și virale la animale	127
Izolarea și identificarea virusurilor în diagnosticul infecțiilor virale la animale	127
Punerea în evidență a corpusculilor elementari în frotiuri	130
Punerea în evidență a incluziilor în frotiuri	133
Recoltarea și prepararea materialului patologic	134
Baza materială necesară pentru lucrările de virusologie	138
Culturile celulare în diagnosticul virusologic	141
Tripsinizarea	147
Contaminarea culturilor celulare	148
Analiza cromozomială a culturilor celulare	149
Inocularea culturilor celulare	150
Citirea și interpretarea rezultatelor	

Metode directe	150
Metode indirecte	161
Inocularea ouălor embrionate de găină	162
Inocularea animalelor de experiență în vederea izolării, întreținerii sau tipizării unor virusuri	170
Teste de sensibilitate a virusurilor	172
Reacțiile serologice în identificarea virusurilor și diagnosticul infecțiilor virale	172
Tehnici pentru cercetarea virusurilor bacteriofagice	180
Metode de examinare a rickettsiilor și chlamidiilor	185
Examenul histopatologic	190
Tehnica secționării la gheață	192
Examenul pe țesuturi fixate	193
Metode de incluzie	196
Secționarea	201
Operațiuni ulterioare secționării	205
Colorarea	207
Montarea	213
Impregnările metalice	214
Metode de diagnostic histopatologic rapid	216
Metode curente de diagnostic hematologic	220
1 — Numărarea globulelor roșii	220
2 — Numărarea globulelor albe	224
3 — Numărarea eozinofilelor	226
4 — Numărarea trombocitelor	226
5 — Numărarea reticulocitelor	228
6 — Dozarea hemoglobinei	229
7 — Determinarea vitezei de sedimentare a hematilor (VSH)	230
8 — Determinarea hematocritului (PCV)	230
9 — Determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM)	232
10 — Determinarea hemoglobinei eritrocitare medii (HEM)	233
11 — Determinarea concentrației în hemoglobină eritrocitară medie (CHEM)	233
12 — Determinarea timpului de sîngerare	233
13 — Determinarea timpului de coagulare	234
14 — Examenul morfologic al singelui	235
Tehnica îmbogățirii frotiurilor în leucocite și trombocite	236
Efectuarea frotiurilor de singe	236
Colorarea frotiurilor de singe	239
Valoarea frotiului de singe	245
Morfogenie și tinctorialitate celulară	248
Particularități morfo-tinctoriale ale elementelor figurate pe specii de ani- male	249
Citodiagnosticul	260
1 — Puncția medulo-osoasă	260
2 — Puncția ganglionară	261
3 — Examenul lichidelor patologice de revărsare	262
4 — Examenul citologic al lichidului cefalorahidian	263
5 — Examenul citologic al sedimentului urinar	264
Metode de examinare a micoplasmelor și infecțiilor micoplasmice	270
1 — Examenul microscopic	271
2 — Examenul cultural	271
3 — Examene biochimice	273
4 — Examenul capacității hemolitice	274
5 — Examene serologice	274
6 — Inoculări experimentale	276
7 — Izolarea și cultivarea micoplasmelor pe culturi celulare	276
8 — Examenul histopatologic	276
Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micozelor	278
Recoltarea, ambalarea, conservarea și transportul materialului patologic în vede- rea examenului micologic de laborator	278
1 — Examenul macroscopic	279
2 — Examenul microscopic direct	280
3 — Examenul cultural	285

4 — Examenul caracterelor biochimice	293
5 — Examenul histopatologic	295
Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micotoxicozelor	298
Recoltarea, ambalarea și transportul probelor de furaje	298
1 — Examenul organoleptic	299
2 — Examenul microscopic direct	299
3 — Examenul cultural cantitativ	299
4 — Examenul cultural calitativ	300
5 — Testarea micotoxicității probelor de furaje	301
Determinarea sensibilității fungilor față de acțiunea micostaticelor (antimico- grama)	304
Termeni micologici folosiți frecvent	304
Conservarea microorganismelor și a unor materiale biologice	306
— Conservarea unor culturi microbiene inactivate	309
— Conservarea virusurilor	310
— Conservarea serurilor imune	311
— Conservarea alexinei	311
— Conservarea frotiurilor	312
Prepararea unor soluții colorante și reactivi de laborator de uz curent	313
1 — Coloranți și soluții folosite în colorări	313
2 — Soluții tamponate	315
3 — Soluții izotonice	317
4 — Soluții indicatoare	317
5 — Alți reactivi de laborator	318
6 — Diverse	320
Anexo	325
Bibliografie selectivă	341

Laboratory diagnosis in the veterinary medicine

Contents

Introduction	11
Labour protection in laboratory	15
Sterilization and disinfection	18
Technique of sampling, packind and transportation of pathological materials for laboratory examination	27
Microscopic examination	32
Technis of preparing smears	35
The most important staining methods for bacterioscopic examination	36
Determination of bacteria dimensions	42
Bacteriological examination	43
Culture media used for the isolation of different types of bacteria	49
Examination of culture characters	63
Metabolic (biochemical) character examination of bacterial germs	66
Special tests used in identifying of mycobacteria	74
Determination of germ sensitivity to antibiotic and other therapeutical substances	78
Determination of elaboration capacity of some bacterial toxins	86
Pathogenity testing of bacterial germs meant for test animals	87
Determination of germ number in a produce	97
Obtaining of bacteriocidins	99
Preparation of bacterines	101
The serological examinations as methods of deecларation of virus and bacterial infections in animals	103
Isolation and identification of viruses in viral infestions diagnosis in animals	127
— Rendering evident of elementary bodies in smears	127
— Rendering evident of inclusions in smears	130
— Sampling and preparation of pathological material	133
— Material basis necessary for virus works	134
Cell cultures in virus diagnosis	138
Inoculation of embryonated hens'eggs	162
Inoculation of test animals for isolation, maintenance or for virus typing	170
Serological reactions in virus identification	172
Techniques for searching bacteriophage viruses	180
Methods of examining rickettsia and ehlamydia	185
Histopathological examination	190
Section technique with ice	192
Examination on fixed tissues	193
Methods of inclusion	196
Section	201
Operations after section	205
Staining	207

Installing	213
Metalic permeation	214
Methods of rapid histopathological diagnosis	216
Current methods of haematological diagnosis	220
Counting of red cells	224
Counting of white cells	226
Counting of eosinophils	226
Counting of thrombocytes	228
Counting of reticulocytes	229
Haemoglobin dosage	230
Determination of erythrocyte sedimentation rate	230
Haematocrit determination	232
Determination of average erythrocytic volume	233
Determination of average erythrocytic haemoglobin	233
Determination of concentration in average erythrocytic haemoglobin	233
Determination of bleeding duration	234
Determination of coagulation time	235
Morphological examination of blood	236
— Enriching technique of smears in leucocytes and thrombocytes	236
— Making blood smears	239
— Staining of blood smears	245
— The value of blood smear	248
— Morphogenesis an cellular tincture	249
— Morpho-tinctorial peculiarities of figured elements in species of animals	260
Cytodiagnosis	260
1 — Medullo-osseous puncture	261
2 — Ganglionic puncture	262
3 — Examination of pathological overflowing liquids	263
4 — Cytological examination of cerebrospinal fluid	264
5 — Cytological examination of urinary sediment	270
Methods of examining mycoplasmas and mycoplasmic infections	270
1 — Microscopic examination	271
2 — Culture examination	271
3 — Biochemical examination	273
4 — Examination of hemolytic capacity	274
5 — Serological examination	276
6 — Experimental inoculations	276
7 — Isolation and cultivation of mycoplasmas in cell cultures	276
8 — Histopathological examination	278
Laboratory methods and techniques for the diagnosis of mycosis	298
Laboratory methods and techniques for the diagnosis of mycotoxicoses	306
Conservation of microorganisms and of some biological materials	313
Preparation of some staining solutions and reagent of current laboratory use	325
Annexe	

Introducere

Utilizarea metodelor de laborator în diagnosticul diferitelor stări de boală la animale a apărut odată cu descoperirea primelor metode bacteriologice, serologice, virusologice, histopatologice, hematologice, biochimice, capabile să pună în evidență tulburări intime, nedecelabile prin mijloacele de investigație clinică și anatomopatologică. Ea a presupus o îndelungată muncă de cercetare a stărilor fiziologice și apoi a modificărilor ce se instalează în cursul stărilor de boală. Se poate spune că punctul de plecare l-a constituit cunoașterea limitelor fiziologice de variație a funcțiilor și structurilor organice, pe baza cărora s-a pornit la studierea deviațiilor care intervin în cursul proceselor patologice.

Utilizarea metodelor de laborator este legată de toate marile descoperiri realizate în decursul timpului în materie de biologie, medicină, chimie și alte domenii de graniță.

Printre primele procedee de laborator folosite în scop de diagnostic, este examenul bacterioscopic. Examinarea diferitelor produse patologice de la indivizii bolnavi și evidențierea agenților etiologici au constituit baza diagnosticului de certitudine într-o serie de boli infecțioase și parazitare și, pentru unele, o mai constituie și azi. Astfel, examenul frotiurilor de sânge, cu evidențierea paraziților în hemosporidiozele animalelor sau a ouălor de paraziți în helmintozele gastrointestinale, evidențierea germenilor în sânge, în cazul bolilor septicemice sau în diferite țesuturi și organe, în secreții și excreții, în exsudate și transsudate, reprezintă și azi procedee ajutătoare, fără de care nu se poate concepe un diagnostic etiologic sigur.

Există o serie de boli în care conflictul activ între macro- și micro-organisme se soldează cu apariția anticorpilor specifici aglutinanți, precipitanți, fixatori de complement, floculanți etc., a căror punere în evidență este de o hotărâtoare importanță, atât pentru precizarea diagnosticului individual, cât și pentru depistarea animalelor cu forme incipiente sau inaparente clinic. Eliminarea unor asemenea exemplare din efective este cu atât mai importantă, cu cât ele reprezintă, în marea majoritate, pericole iminente, datorită faptului că sînt eliminatoare de germeni patogeni pentru celelalte animale. Astfel se poate aminti bruceloza, leptospiroza, morva, durina, tifopuloroza care-și bazează măsurile de eradicare în bună măsură pe aplicarea reacțiilor serologice.

În unele dintre aceste boli, semnele clinice prezentate de animale în cursul vieții sau modificările anatomopatologice constatate după moarte

sau sacrificare sînt cu totul necaracteristice sau incomplete, astfel încît numai pe baza lor nu se poate stabili un diagnostic de precizie. În asemenea cazuri reacțiile serologice sînt menite să elucideze situația.

În alte cazuri, în cursul lucrărilor de laborator, izolarea unor germeni sau virusuri necesită, pentru identificarea lor exactă, de asemenea, unele reacții serologice. Astfel, în infecțiile salmonelice, colibacilare, leptospirice, precizarea tipului infectant se bazează în mare măsură pe reacțiile serologice, de aglutinare. Pseudopesta aviară, pesta porcină, infecțiile cu adenovirusuri la bovine, infecțiile cu virusul parainfluenței la bovine și porcine și altele, își bazează identificarea agenților respectivi pe reacții de hemaglutinare și inhibare a aglutinării, pe seroneutralizări etc.

În alte boli, se instalează modificări sanguine a căror precizare permite atît stabilirea diagnosticului, cît și orientarea măsurilor terapeutico-profilactice. Astfel, în stările de anemie, cauzate de tulburări la nivelul sistemului hematopoetic, procese septic, stările hemolitice cauzate de arsuri, substanțe toxice anorganice (nitriți și nitrați, plumb), organice (anilină, nitrotoluen, fenilhidrazidă, sulfapiridină) sau toxine hemolitice (veninul de șarpe, ciuperci otrăvitoare), stabilirea gradului de anemie, coroborată cu celelalte date clinice, anamnetice și eventual anatomopatologice, permite orientarea spre cauzele care au generat procesul patologic și implicit eliminarea lor.

În leucoză, la diferite specii, se instalează o serie de modificări cantitative și calitative ale elementelor figurate sanguine, a căror interpretare constituie criterii de diagnostic deosebit de utile, uneori hotărîtoare. Existența unui număr crescut din unele componente celulare, cuplată cu evidențierea formelor tinere, anormale sau în mitoză, sînt modificări extrem de importante pentru diagnostic.

În multe stări de boală tulburările ce se instalează nu au gradul de specificitate care să permită stabilirea unui diagnostic etiologic. Așa de exemplu, enteritele tineretului la toate speciile pot fi provocate de agenți foarte variați, de natură bacteriană, virală, parazitară, alimentară, mecanică etc., și îmbracă, din punct de vedere simptomatologic, aspecte care sînt foarte asemănătoare. În asemenea cazuri, numai identificarea factorului cauzal este în măsură să permită luarea unor măsuri terapeutice și profilactice corespunzătoare. Izolarea agentului etiologic permite, în același timp, să se acționeze adecvat și cu cele mai potrivite mijloace terapeutice. Astfel, în cazul infecțiilor colibacilare, streptococice, pasteurelice, pe lîngă faptul că izolînd germenii respectivi se cunoaște cauza, prin stabilirea cu ajutorul antibiogramei a spectrului lor de sensibilitate față de antibiotice și bacteriostatice, se poate acționa în mod eficient pentru tratarea cazurilor de boală și pentru prevenirea apariției de noi îmbolnăviri la animalele expuse. Faptul este cu atît mai important, cu cît la ora actuală o serie din infecțiile foarte frecvente atît la tineret, cît și la adulți (enterite, pneumopatii, metrite, mamite, meningite) sînt provocate de germeni care nu sînt sensibili față de antibiotice de uz larg, astfel încît utilizarea acestora s-ar solda cu cheltuieli inutile și ar fi ineficace. Există de exemplu, cazuri frecvente de colibaciloză la viței în care tulpinile ce acționează într-un focar dovedesc sensibilitate față de un singur antibiotic.

Există entități morbide care se traduc prin alterații tisulare, a căror specificitate poate fi precizată numai printr-un examen histopatologic. Într-o serie dintre ele, modificările ce se produc sînt atît de caracteristice încît au cea mai importantă valoare diagnostică. Este suficient să ne gîndim la existența corpusculilor Babeș-Negri din turbare, la incluziile variolice, la granulomul tuberculos și morvos, la incluziile Seifried din laringotraheita infecțioasă, la celulele tumorale din diferite focare neoplazice, la hemosideroza hepatică din anemia infecțioasă a calului etc.

În unele stări de intoxicație (cu sare, cu substanțe insecticide și cu alte toxice de diferite origini) examenul de laborator este cel care permite elucidarea situației.

În stările de carență, atît de dăunătoare mai ales în condițiile creșterii animalelor în mari complexe industriale, determinarea tipului carențial este uneori imposibilă fără aplicarea unor examene de laborator. Carențele în oligoelemente, săruri minerale, vitamine, aminoacizi pot fi stabilite precis numai prin dozări de laborator.

Și diagnosticul unor stări fiziologice sau patologice de domeniu obstetrical se bazează pe mijloace de laborator. Este suficient în acest sens să amintim diagnosticul precoce al gestației și cel al mamitelor, ambele atît de importante pentru practica actuală.

Există desigur și procedee de laborator de mare finețe și foarte pretențioase din punct de vedere tehnic, cum ar fi examenele de imunofluorescență, electroforetice, electrono-microscopice, care se încadrează tot în acest context, dar care presupun desigur o pregătire de specialitate foarte atentă și, adesea, o îndelungată experiență, care vizează abordarea procedeelelor celor mai importante și uzuale aplicabile la ora actuală în condițiile dotării materiale din laboratoarele veterinare.

Trebuie subliniat totodată că în concepția medicului veterinar actual trebuie să existe o viziune de ansamblu a fenomenelor biologice. Prin pregătirea sa profesională, medicul veterinar este un biolog care trebuie să înțeleagă și să interpreteze procesele în fața cărora este pus. El este chemat, ca urmare, să coroboreze toate datele pe care le consideră utile în vederea precizării unui diagnostic și a instituirii celor mai adecvate măsuri de tratament și profilaxie. Numai imbinarea competentă a tuturor factorilor care stau la baza apariției unei stări de boală poate să elimine greșelile de diagnostic și, ca urmare, erorile în aplicarea măsurilor corespunzătoare. Tentația de a privi adesea problemele, unilateral, dintr-un singur punct de vedere, se poate solda cu serioase greșeli de interpretare, care nu rareori au ca urmare grave implicații economice. Trebuie avută în vedere și posibilitatea coexistenței mai multor cauze, care se suprapun și care complică situația dată. Izolarea unui germen nu înseamnă neapărat că el este agentul cauzal. Este necesar ca eventualitatea de a-l desemna ca factor etiologic să fie pusă față în față cu alte posibilități, relevate de datele pe care le furnizează anamneza, dinamica îmbolnăvirilor și a mortalității, tabloul clinic și anatomopatologic, precum și alte mijloace de investigație.

Medicul veterinar practician, chiar dacă nu are posibilitatea de a aplica anumite metode de diagnostic mai pretențioase, trebuie să știe să ceară efectuarea lor la nivelul laboratoarelor județene. De asemenea

este necesar să știe să interpreteze datele pe care acestea le oferă prin buletinele de analiză sau prin indicațiile date.

Nu este lipsit de interes să se sublinieze că și la nivelul dotației modeste pe care o presupun unitățile de teren, medicul practician poate să efectueze anumite examene de laborator mai puțin pretențioase, fapt care îi conferă, pe de o parte, siguranță și erudiție profesională, iar pe de altă parte prestigiul în fața factorilor tehnici cu care conlucrează. Existența în dotarea unei bune părți din aceste unități a microscopelor și a altor ustensile de strictă necesitate, permite efectuarea unui minim de examene, care adesea contează hotărâtor în aplicarea promptă a măsurilor necesare. Astfel, de exemplu, practicarea unor frotiuri din sângele animalelor vii cu forme septicemice de antrax sau din organele animalelor sacrificate de necesitate și suspecte, permite o decizie promptă în aplicarea măsurilor referitoare la restul efectivului. Asemenea acțiuni ar evita, fără îndoială, și accidentele grave cauzate, de exemplu, de darea în consum a cărnii provenită de la asemenea animale și care este atât de periculoasă, dată fiind receptivitatea omului, mai ales în cazul existenței unor leziuni.

Efectuarea unor examene ovohelminoscopice sau a unor simple preparate între lamă și lamelă permite un diagnostic prompt într-o serie de boli parazitare de largă răspândire. Este suficient să se amintească în acest sens ascaridoza, strongiloza, coccidioza, fascioloza, moniezioza, dictiocauloza, scabia, a căror existență poate fi confirmată pe loc, cu aceeași precizie cu care o face un laborator veterinar. Este necesară însă preocuparea în acest sens, strădania de autodotare, chiar dacă aceasta are izul unor improvizații. Esențial este ca ele să-și atingă scopul și să se obțină rezultate.

Ar fi bine, poate, de amintit că, în calitatea sa, medicul veterinar este chemat să întreprindă și lucrări de cercetare. Acestea pe lângă că satisfac valențe de ordin practic pe linie profesională, conferă celui ce le întreprinde un plus de probitate științifică, îi permit să argumenteze competent că ceea ce susține derivă din observații și expertize personale. Acest lucru permite de asemenea un contact permanent cu noutatea, cu progresele științei veterinare și, implicit, cu aplicarea mijloacelor celor mai adecvate pentru etapa actuală. Așa cum în întreprinderi funcționează laboratoarele uzinale, iar în agricultură cîmpurile experimentale, trebuie să fie posibil și ca medicul veterinar să efectueze o muncă de cercetare chiar la nivelul unităților de producție. Zootehnia modernă, prin condițiile de cercetare și de exploatare în mari efective, favorizează culegerea de informații pe un număr mare de indivizi, ceea ce face ca constatările să aibă o bază cazuistică bogată. Trebuie numai ca datele să fie interpretate și puse în slujba practicii curente.

Protecția muncii în lucrările de laborator

Prin specificul activității sale, medicul veterinar este permanent în situația de a lucra într-un mediu care presupune pericole. În munca de laborator aceste pericole constau în special în aceea că o serie dintre agenții bacterieni, virali și chiar parazitari întâlniți la animale, au caractere de patogenitate și pentru om. Așa-numitele antropozoonoze pot să fie transmise acestuia fie prin contactul direct cu animalele bolnave sau purtătoare și eliminatoare de germeni, fie prin manipularea produselor patologice de la acestea sau a materialelor contaminate. Antraxul, morva, leptospiroza, febra Q, turbarea, salmoneloza, psitacoza, tuberculoza, tetanosul, botulismul, tularemia, trichineloză, tricofitia, toxoplasmoza, sînt numai cîteva exemple din cele peste 100 de entități morbide care, pe tot globul, sînt comune omului și animalelor. Pericolul pe care îl reprezintă trebuie considerat cu atît mai important, cu cît multe din aceste infecții pot genera accidente mortale, prin gravitatea cu care evoluează. Este semnificativ în acest sens să se sublinieze că boli ca turbarea, botulismul etc., sînt necruțătoare.

Laboratoarele și încăperile anexe vor fi ținute în permanență într-o ordine perfectă. După terminarea lucrărilor, de fiecare dată, materialele (instrumentar, ustensile etc.) cu care s-a lucrat se adună și se trimit la sterilizare în cazul că s-a lucrat cu produse contaminate, sau se spală în celelalte cazuri. Ele se pun apoi în dulapuri speciale pe categorii, pentru ca la nevoie să se știe de unde pot fi luate. Este bine ca în asemenea laboratoare să existe dulapuri separate pentru diferitele categorii de ustensile: sticlărie sterilizată, coloranți, instrumente, reactivi și magazii corespunzătoare pentru medii de cultură neinoculate, pentru culturi care se păstrează la temperatura camerei, camere frigorifice pentru cele care se conservă la temperaturi joase, sau refrigeratoare pentru produse biologice, care se congelează. Toate acestea trebuie să poarte etichete detaliate cu privire la conținutul recipientelor.

Mesele de lucru se lasă după fiecare lucrare în stare de curățenie perfectă și se dezinfectează, pentru ca, la începerea unor lucrări noi, să existe condiții corespunzătoare de lucru.

Ca urmare, respectarea unor principii de protecție a muncii este o necesitate cît se poate de stringentă, mai ales în condițiile activităților de laborator, care presupun un contact permanent cu surse generatoare de asemenea accidente. Iată cîteva dintre acestea:

— În laboratoare, una dintre condițiile sine qua non o reprezintă

îmbrăcămintea și materialele de protecție. Utilizarea halatelor de protecție este menită să evite contaminarea sau deteriorarea prin diferiți reactivi chimici a îmbrăcămintei proprii și, în același timp, permite aplicarea corespunzătoare a operațiunilor de sterilizare.

— Folosirea măștilor de tifon individuale se impune ori de câte ori se lucrează cu materiale conținând germeni transmisibili pe cale aerogenă.

— Utilizarea mănușilor de cauciuc, mai ales când se lucrează cu materiale patologice suspecte de a conține germeni patogeni (în caz de turbare, antrax, leptospiroză etc.), permite o manipulare fără riscuri a acestora și evită deci accidente.

— Manipularea instrumentelor, a aparatelor și materialelor contaminate sau suspecte de contaminare se va face cu deosebită atenție, evitându-se atingerea părților care au venit în contact cu materialele suspecte. Ele se vor reutiliza numai după prealabila sterilizare prin fierbere, autoclavare sau prin acțiunea agenților chimici.

— În cazul în care se întâmplă să se atingă totuși asemenea materiale contaminate sau suspecte, se va recurge imediat la spălarea minuțioasă cu apă caldă și săpun a regiunilor atinse după care se vor dezinfecta cu soluții dezinfectante (cloramină 2%, formol 1%, sodă caustică 0,5%). Aceeași conduită se adoptă și când se vine în contact cu medii de cultură în care s-au cultivat germeni sau cu suspensii bacteriene necesare diferitelor operațiuni de diagnostic bacteriologic etc.

— Dacă masa de lucru a fost contaminată cu produse care conțin germeni (culturi microbiene, suspensii virale, organe suspecte) se va acoperi zona respectivă cu vată sau tifon îmbibate cu substanțe antiseptice și numai după ce a trecut un timp necesar distrugerii acestora, se trece la curățirea propriu-zisă a locului respectiv. Când asemenea materiale ajung pe halatul de protecție acesta va fi dat imediat la sterilizare (fierbere sau autoclavare) și numai după aceea va fi reutilizat.

— Dacă pe masă au ajuns substanțe chimice periculoase, ele vor fi în prealabil neutralizate și numai apoi se îndepărtează (dacă sînt substanțe alcaline se vor neutraliza cu acizi și invers).

— Nu vor fi lăsate niciodată materiale sau vase conținând eventuali agenți patogeni, descoperite sau în poziții care să expună la contaminări.

— Este interzisă utilizarea de pipete în operațiuni cu materiale conținând germeni sau soluții chimice periculoase, fără ca ele să aibă la partea superioară un dop de vată de protecție. Este preferabil în aceste cazuri să se pipeteze cu pere de cauciuc, evitându-se aspirarea cu gura. Se pot folosi în asemenea cazuri, ca și atunci când se lucrează cu soluții caustice sau toxice, pipetele cu bulă de siguranță.

— Când se lucrează cu substanțe toxice care degajă vapori nocivi, este necesar să se recurgă la nișe speciale cu hote de evacuare sau în boxe care să evite orice accidente.

— Este interzis fumatul, mîncatul și băutul în încăperile în care se lucrează cu germeni sau cu substanțe toxice.

— Manipularea animalelor de experiență necesare inoculărilor experimentale se va face cu deosebită atenție, după o prealabilă contenție corespunzătoare, care să le facă inofensive pe tot cursul operației.

Dacă, cu toate măsurile de protecție luate se întâmplă totuși anumite accidente se vor avea în vedere următoarele:

— Orice lichide (suspensii bacteriene sau virale, stropi din materialul patologic suspect) care ajung la nivelul cavității bucale nu vor fi deglutite, ci imediat scuipate. Imediat se procedează la spălări și gargarisme repetate cu soluții de permanganat de potasiu 1‰ sau apă oxigenată 1‰. Apoi se clătește gura cu apă, fără a se degluti; operațiunea se repetă de mai multe ori, timp de o oră.

— În situația când, în mod reflex, materialul infecțios a fost deglutit, se vor face spălături repetate și gargare cu aceleași soluții pe lângă care se vor degluti soluții slabe (n/10) de acid clorhidric și se va încerca provocarea reflexă a vomizării. Operațiunea se repetă de mai multe ori.

— Dacă lichide septice sau suspecte ajung pe conjunctivă, în primul rând se va evita pe cât posibil să se clipească, pentru a evita difuzarea în sacul conjunctival. Se recurge imediat la spălarea cu apă și apoi cu o soluție slabă de oxicianat 0,001‰. Deoarece lichidele acestea pot ajunge prin canalul lacrimo-nazal în cavitatea nazală și bucală se vor face concomitent și operațiunile enunțate la dezinfecția gurii. Nasul se va sufla energic evitându-se inspirația pe nas. Se va instila apoi soluție de oxicianat 0,001‰.

— În cazul că în cursul operațiunilor de inoculare la animalele de experiență se produc mușcăături sau zgîrieturi, se va recurge la spălarea imediată a rănii, lăsarea să singereze din abundență și apoi badijonarea cu tinctură de iod și pansarea.

— Dacă este vorba de material conținând germeni foarte periculoși (antrax, turbare, tetanos), pe lângă măsurile acestea de urgență se va solicita imediat intervenția medicului, pentru instituirea măsurilor de prevenire a infecției.

Fiecare laborator sau grup de laboratoare, avînd un anumit specific de lucru, trebuie să dispună de un dulăpior sanitar în care să existe un minimum de ustensile și produse farmaceutice de prim ajutor (vată, tifon, alcool, tinctură de iod, soluție de 1‰ permanganat de potasiu, soluție 1‰ apă oxigenată, soluție 0,001‰ oxicianat, unguente cu antibiotice cum sînt penicilina, cloramfenicolul, aureomicina). Ele trebuie să fie amplasate în locuri ușor accesibile.

Sterilizarea și dezinfecția

În laboratoarele în care se lucrează cu agenți patogeni, sterilizarea și dezinfecția reprezintă operațiuni deosebit de importante, în primul rând pentru preîntâmpinarea contaminării personalului, dar și pentru a împiedica difuziunea în mediu a acestor agenți.

Sterilizarea este un termen larg care presupune distrugerea microorganismelor, indiferent de mijlocul folosit, în timp ce prin dezinfecție se înțelege în special distrugerea germenilor cu ajutorul unor substanțe chimice.

Sterilizarea se poate realiza prin agenți fizici și chimici.

Sterilizarea prin agenți fizici

- a) Sterilizarea prin căldură poate fi uscată (flambare, încălzire la roșu, aer cald) și umedă (fierbere, autoclavare, tindalizare, pasteurizare);
- b) Sterilizarea prin radiații: ultraviolete, gamma;
- c) Sterilizarea prin filtrare.

a) Sterilizarea prin căldură

Sterilizarea prin căldură uscată poate fi de mai multe feluri.

— *Sterilizarea prin flambare* este cea mai simplă și constă în trecerea obiectului sau a suprafeței de sterilizat prin flacără timp de câteva secunde, de mai multe ori la interval de 3—4 secunde. Metoda se folosește în cazul pipetelor Pasteur (extremitatea efilată), pentru sterilizarea gurii eprubetelor și flacoanelor sau altor recipiente când se lucrează steril. Nu se pot steriliza prin flambare obiectele din materiale inflamabile.

Sterilizarea prin încălzire la roșu este folosită în cazul anselor de însămînțare și a spatulelor.

Sterilizarea prin aer cald se realizează în diferite cuptoare în care aerul este încălzit între anumite limite convenabile scopului urmărit (etuve, sterilizatoare Poupinel, cuptoare Pasteur). Majoritatea lor funcționează pe bază de rezistențe electrice și sînt prevăzute cu termoregulate.

Obiectele care urmează a fi sterilizate trebuie să fie uscate și se învelesc în hîrtie albă, care joacă și rolul de indicator al sterilizării, în

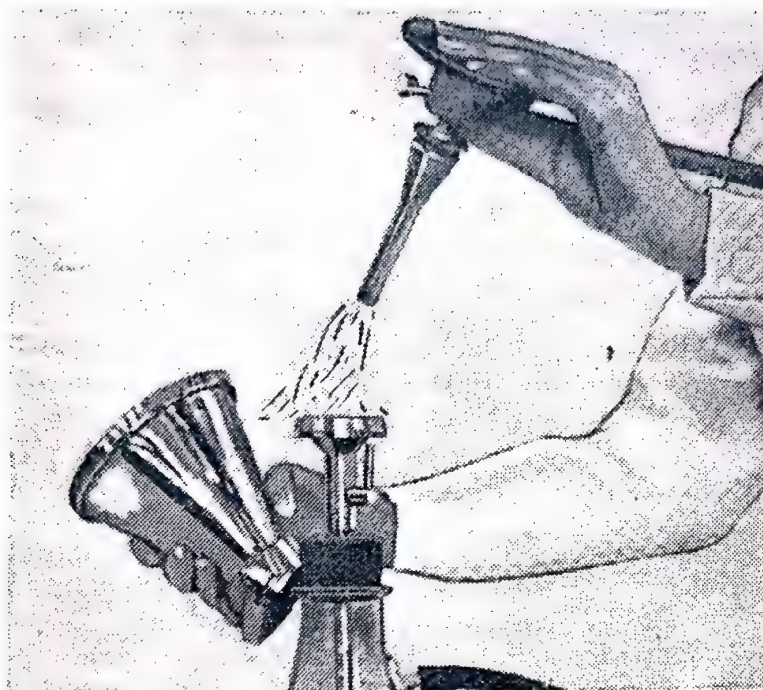


Fig. 1 — Sterilizarea prin flambare

sensul că aceasta este corectă cînd hîrtia, sub acțiunea căldurii, devine cafenie. Ea trebuie însă să rămînă intactă. Timpul de sterilizare diferă cu temperatura:

- la 160°C — sînt necesare 2 ore;
- la 170°C — este necesară o oră;
- la 180°C — este necesară $1/2$ oră.

Se înțelege că se sterilizează în acest mod materialele și obiectele care nu se deteriorează la aceste temperaturi (sticlăria și în nici un caz materialul plastic, obiectele de cauciuc, sticlăria cu armături metalice). Sticlăria de laborator cum ar fi pipetele gradate, plăcile Petri, mojarale, țeava fuzibilă, baloanele etc., se pot steriliza în condiții foarte bune cu aer cald, dar și prin autoclavare.

Sterilizarea prin căldură umedă poate fi și ea de mai multe feluri.

Sterilizarea prin fierbere se folosește mai ales pentru instrumentele metalice, pentru seringi, dopuri, garnituri, racorduri sau alte obiecte de cauciuc. Pentru a le proteja de acțiunea nocivă a unor săruri conținute de apa de robinet, este indicată fierberea în apă distilată, la care se adaugă borax sau carbonat de sodiu, pentru a împiedica ruginirea. Durata fierberii este de cel puțin 30 de minute din momentul clocotirii apei. Temperatura de 100°C , timp de o jumătate de oră, distruge toate formele vegetative și chiar unele forme microbiene sporulate. Trebuie specificat că există spori bacterieni care rezistă la 100°C , fapt care face ca metoda să nu fie suficientă, mai ales dacă se impun condiții riguroase de sterilizare. În plus, obiectele sterilizate în acest fel nu pot fi întrebuințate ca sterile decît imediat după fierbere.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea) se realizează în aparate speciale denumite autoclave. Ele sînt niște cazane care se pot închide ermetic și în care, printr-o sursă calorică (gaz sau cu-

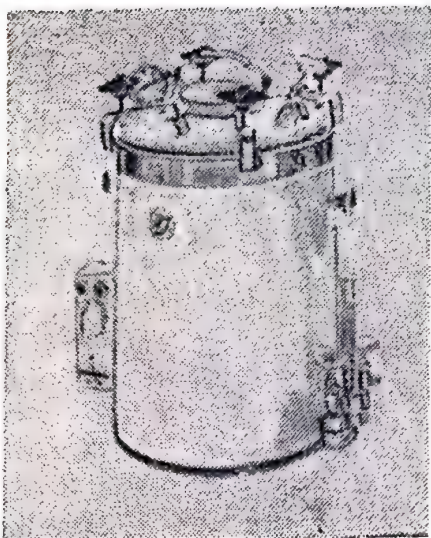


Fig. 2 — Autoclav electric

rent electric), se poate realiza o atmosferă de vapori încălziți la 100—135°C și sub presiunea de 1—2 atmosfere. Fiecare autoclav trebuie să fie prevăzut cu un manometru care indică presiunea interioară și indirect temperatura (cunoscând că unei atmosfere îi corespunde temperatura de 120°C). Este important de subliniat că prin intermediul unui robinet special, înainte de sterilizarea propriu-zisă trebuie eliminat aerul din interior, presiunea realizându-se pe seama vaporilor de apă existenți în cazan. Pentru evitarea eventualelor accidente cauzate de suprapresiuni datorite nesupravegherii, autoclavele sînt prevăzute și cu supape de siguranță. Durata necesară sterilizării este variabilă cu presiunea realizată:

- la 0,5 atmosfere (112°C) — 90 de minute;
- la 1,0 atmosferă (120°C) — 30 minute;
- la 2,0 atmosfere (134°C) — 10 minute.

Prin autoclavare se sterilizează majoritatea mediilor de cultură, sticlăria, aparatele de sticlă cu garnituri de cauciuc, materiale de protecție, soluțiile și toate materialele infecte. Acestea se așază în cutii de tablă cu pereți găuriți, în coșuri din plasă de sîrmă (flacoanele cu medii sau soluții, eprubetele) sau în cazoale (vată, materiale de protecție). Recipientele conținînd lichid, pe lângă dopul de vată, trebuie să fie legate la gură și cu hîrtie. Recipientele al căror dop a fost aruncat în cursul sterilizării, nu se consideră sterilizate.

Presiunea și implicit temperatura din interiorul autoclavului sînt controlabile cu ajutorul manometrului, dar se poate recurge la nevoie și la determinări cu ajutorul unor substanțe care la temperatura camerei sînt solide dar peste anumite limite, cunoscute, se lichefiază. În acest scop, ele se introduc în tuburi capilare, închise la flacără, care se pun în autoclav odată cu materialele de sterilizat și se verifică dacă, la deschiderea capacului, ele sînt sau nu în stare lichidă, aceasta indicînd atingerea temperaturii dorite. Dintre substanțele cele mai folosite pot fi amintite următoarele, împreună cu punctul corespunzător de topire: acidul oxalic 101°C, benzonaftolul 110°C, chinina 116°C, sulful (floarea de sulf) 120°C, acidul benzoic 121°C, ureea 132°C.

În vederea sterilizării materialele trebuie pregătite corespunzător:

- pipetele gradate se astupă la extremitatea prin care se aspiră, cu un dop de vată, după care se învelesc în hîrtie sau staniol;
- plăcile Petri și mojarale se împachetează în hîrtie de ambalaj;
- bucățile de țevă din care se confecționează pipetele Pasteur se astupă la ambele capete cu dopuri de vată și se ambalează în hîrtie, cîte 20—30 într-un pachet;
- baloanele se astupă cu dopuri de vată, se învelește gîtul cu hîrtie și apoi se leagă cu sfoară;
- la aparatele de filtrare se împachetează în hîrtie filtrul și tubulura laterală a balonului;

— eprubetele se astupă cu dopuri de vată și tifon, se învelesc în hirtie și se pun în coșuri de sîrmă;

— instrumentele metalice învelite în tifon, se pun în plăci de sticlă care, la rîndul lor, se învelesc în hirtie; se poate face, și este preferabil, sterilizarea în cutii speciale nichelate, prevăzute cu orificii care, la scoaterea din autoclav, se vor închide;

— materialele moi (vată, tifon, pînză) se sterilizează în casolete, ale căror orificii se închid la scoaterea din autoclav.

Sterilizarea prin tindalizare (încălzire fracționată) se folosește cînd substanțele de sterilizat au un grad de termolabilitate, care le face ca la 120°C să se denatureze (medii de cultură conținînd zaharuri sau substanțe proteice macromoleculare cum ar fi oul, serul coagulat etc.). Sterilizarea se face la temperatura suportată de materialele respective, de mai multe ori (2—3 ori) consecutiv, timp de o oră, la interval de 24 de ore. Așa de exemplu, tindalizarea mediilor conținînd zaharuri se face la 100°C, a serului coagulat sau a mediilor cu ou, la 70—80°C. Ea se realizează în autoclavul cu capacul nestrîns sau deschis, sau în dispozitive speciale care realizează condițiile dorite și permit în același timp controlul lor.

Prin acest procedeu, la prima încălzire se distrug formele vegetative ale bacteriilor. Formele sporulate se transformă în vegetative prin termostatare la 37°C care, prin cea de a doua încălzire se vor distruge. Cea de a treia încălzire va asigura sterilizarea completă, prin distrugerea ultimelor forme vegetative rezultate din germinarea sporilor rămași după a doua încălzire.

Sterilizarea prin pasteurizare se folosește pentru lichide, ea realizînd numai distrugerea formelor vegetative, nu și a sporilor. Ea se poate face la 60—65°C timp de 30 minute (pasteurizarea joasă), la 70—75°C timp de 10—20 minute (pasteurizare medie) sau la 85—90°C timp de cîteva secunde, urmată de o răcire bruscă (pasteurizare înaltă). În mod curent, această metodă se folosește în industria laptelui și are ca scop distrugerea germenilor patogeni, fără a altera valoarea alimentară și vitaminele conținute.

b) Sterilizarea prin radiații

Poate folosi razele ultraviolete și radiațiile gamma.

Sterilizarea prin raze ultraviolete se folosește pentru suprafețe plane și încăperi (mai ales boxe sterile). În acest scop servesc lămpile speciale de diferite intensități, ce dau radiații cu o lungime de undă între 2400 și 2800 Å. Numărul acestor lămpi depinde de mărimea suprafeței sau volumul încăperii de sterilizat. Durata iradierii este variabilă, în general de cîteva ore pînă la 24 de ore. Acțiunea lor bactericidă se limitează la formele vegetative.

Sterilizarea prin radiații gamma se folosește în special pentru vasele de material plastic (plăci Petri).

c) Sterilizarea prin filtrare

Sterilizarea prin filtrare se folosește în special pentru gaze sau lichide care trebuie aduse în postura de a fi libere de germeni (bacterieni și micotici). În cazul lichidelor, metoda se folosește mai ales cînd e vorba de soluții care conțin substanțe alterabile prin căldură (toxine, lichide biologice, medii de cultură). Virusurile trec prin porii acestor filtre, așa încît metoda nu poate fi folosită pentru a debarasa aceste lichide de

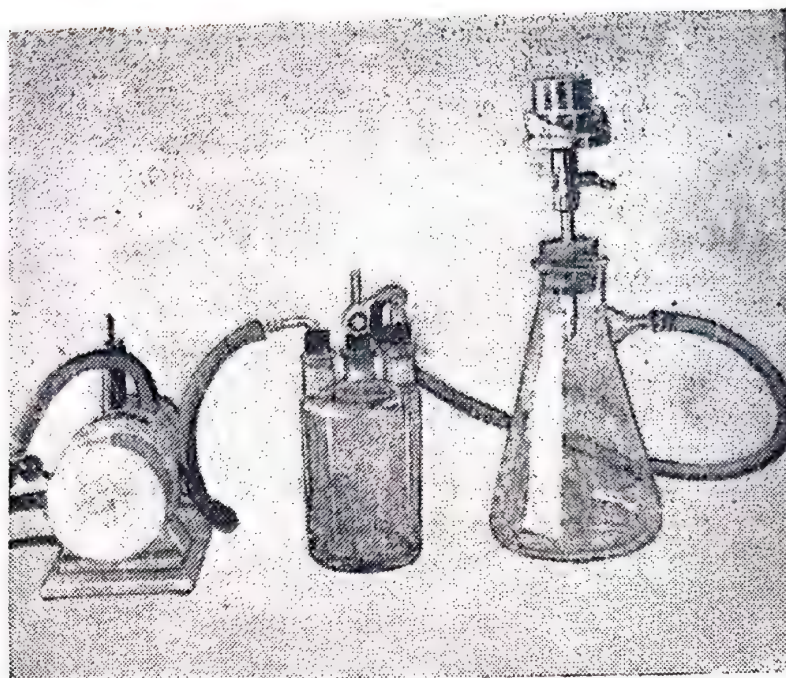


Fig. 3 — Sistem de filtrare cu vid

asemenea agenți (există totuși filtre care rețin unele virusuri, fapt dependent de porozitatea filtrului și de diametrul virusurilor).

Filtrele ce se folosesc în aceste scopuri pot fi de mai multe tipuri:

— Chamberland sînt confecționate din porțelan ars, au forma unor luminări (bujii) și sînt notate cu $L_1, L_2 \dots L_7$, porii cei mai mici fiind în cazul filtrului notat cu L_7 ;

— Berkefeld fabricate din pămînt de infuzorii sau kieselgur au aceeași formă ca și precedentele și au trei grade de porozitate (W = porii cei mai mici, N = pori intermediari, V = pori mari);

— filtre Seitz sînt preparate din amestec de celuloză și azbest, sub formă de plăci filtrante care se montează în dispozitive speciale metalice, care se adaptează la baloane de tip Kitassato, racordabile la vid, deci prin presiune negativă; există și sisteme în care filtrarea se realizează prin presiune în partea superioară a filtrului, deci traversarea plăcilor filtrante se face nu prin aspirație, ci prin presiune; aceste filtre sînt notate în funcție de porozitate cu EKS, EKS_1, EKS_2 și EKS_3 (fil-



Fig. 4 — Filtru de sticlă cu clemă

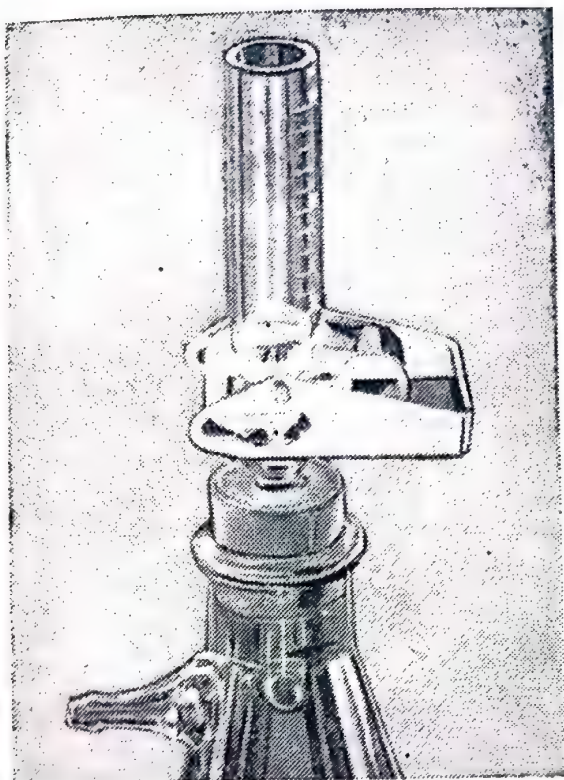


Fig. 5 — Filtru de sticlă adaptat prin dop de cauciuc

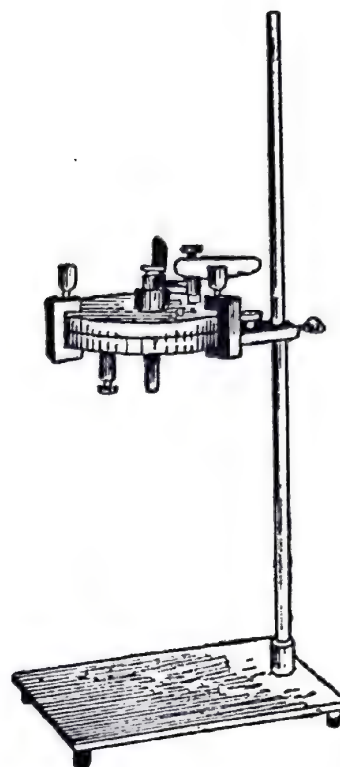


Fig. 6 — Placă filtrantă cu carcasă metalică

trele EKS₁ rețin bacteriile fiind permeabile pentru virusuri, iar EKS₂ rețin și virusurile de dimensiuni mari); se folosesc la separarea unor toxine bacteriene, sterilizarea unor seruri sau lichide contaminate cu bacterii; membranele odată folosite nu mai pot fi refolosite;

— filtrele de sticlă se prezintă sub formă de plăci filtrante montate în pîlnii, de diferite forme și care se adaptează la baloane cu tubulură laterală sau dispun de dispozitive proprii de etanșeizare; cele mai frecvent folosite sînt filtrele tip Schott, notate cu G₁ pînă la G₅, acestea din urmă avînd porozitatea cea mai fină; aceste filtre au avantajul că nu influențează pH-ul lichidelor filtrate și se pot folosi vreme îndelungată, dacă sînt îngrijite corespunzător după fiecare folosire; sterilizarea lor se face numai la autoclav;

— membranele filtrante se pot confecționa din diferite materiale (colodiu, celuloză sau material plastic) și se folosesc în special în virologie, cînd sînt necesari pori de dimensiuni foarte mici (5—3000 milimicroni).

Deosebit de răspîndite au devenit în ultimul timp membranele filtrante celulozice de tip „Millipore” (Millipore Intertech Corp. U.S.A.). Ele au pori de diferite dimensiuni, sînt foarte ușor de manevrat și servesc în scopuri foarte variate: debarasarea unor lichide de germeni, determinări cantitative de germeni din lapte, produse lactate, ape potabile sau reziduale. După scopul în care se folosesc ele se pot adapta la seringi, la vase racordate la pompe de vid sau la pompe de presiune și au capacități variabile.

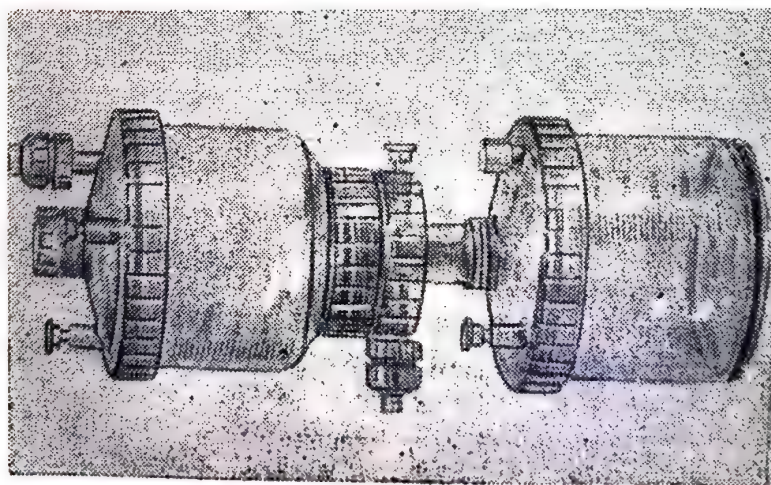


Fig. 7 — Sistem de filtrare din material plastic

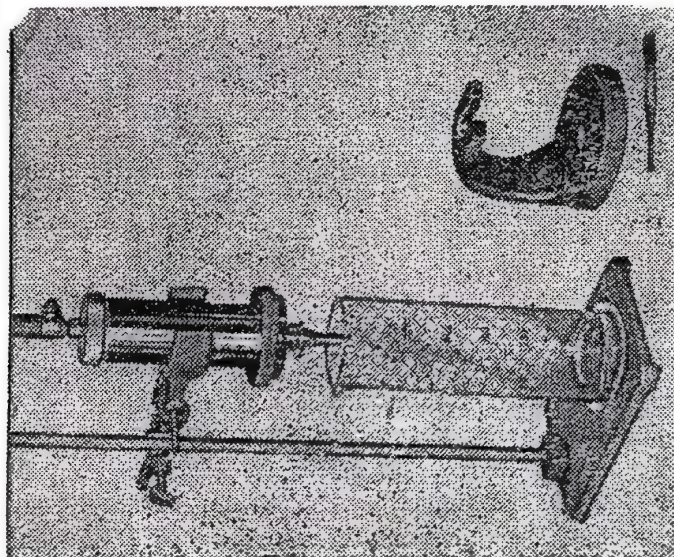


Fig. 8 — Dispozitiv de filtrare, cu preșurător

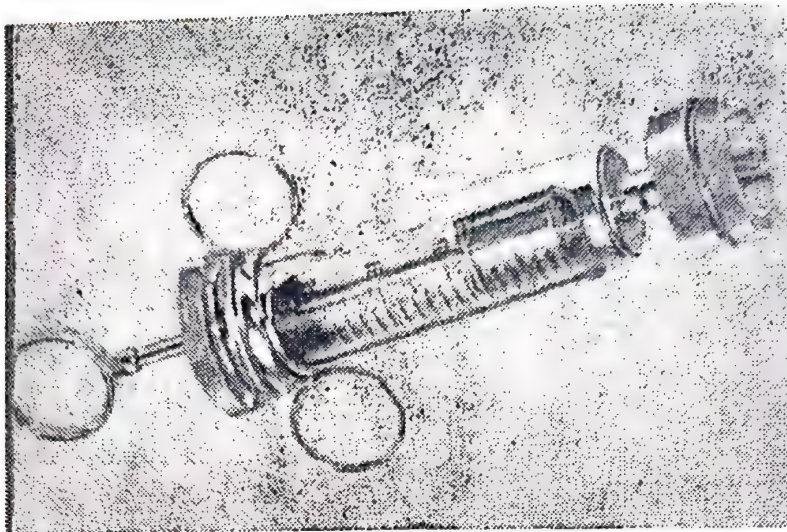


Fig. 9 — Dispozitiv de filtrare adaptabil la seringă

Principalele substanțe chimice cu acțiune dezinfectantă

Tabelul 1

Nr. crt.	Denumirea substanței	Scopul în care este folosită
1	Acid acetic 1%	Dezinfecția pipetelor și lamelor în laboratoarele care se ocupă cu studiul germenilor din genul <i>Leptospira</i>
2	Alcool etilic 70°	Dezinfecția curentă a mâinilor
3	Alcool medicinal	
4	Apa oxigenată 1%	
5	Bicromat de potasiu 5%	Dezinfecția mucoaselor
6	Cloramina	Dezinfecția pipetelor întrebuințate
7	Clorură mercurică (sublimat corosiv)	a) Dezinfecția mâinilor (sol. 1%) b) Dezinfecția meselor de laborator, cuștilor de animale (conc. 5%)
8	Creolina 5–10%	a) Dezinfecția meselor și altor categorii de mobilier din sticlă, faianță, tăvi de material plastic etc. (conc. 0,1%) b) Dezinfecții mai riguroase ale mâinilor
9	Creolina 5–10%	Dezinfecția adăposturilor — în cazul bolilor provocate de agenți nesporulați (dezinfectant slab)
10	Clorura de var (2–5% clor activ)	Dezinfecția curentă a grajdurilor
11	Detergenți diferiți	a) Dezinfecția mâinilor (sol. 0,1%) b) Spălarea sticlăriei
12	Formol — sol. 40%	a) Dezinfecția obiectelor din sticlă, faianță, tăvi de metal din laborator (în conc. de 5%) b) Dezinfecția grajdurilor, curților, obiectelor, în diferite infecții bacteriene și virale (sol. 5%) c) Inactivarea culturilor microbiene în vederea preparării unor vaccinuri (conc. 0,1–2%)
13	Hidroxid de sodiu (soda caustică)	a) Dezinfecția mobilierului, dușumelelor cuștilor de animale (conc. 0,5–3%) b) Dezinfecția adăposturilor de animale și a curților în caz de epizootii (conc. 2–3%)
14	Fenol (acid fenic)	a) Dezinfecția diferitelor obiecte din sticlă, porțelan, metal etc. (sol. 5%) b) Conservarea serurilor imune (conc. 0,5%)
15	Permanganat de potasiu 0,1%	Dezinfecția mucoaselor
16	Oxicianat de sodiu sol. 0,01–0,001%	Dezinfecția mucoaselor
17	Tinctura de iod	Dezinfecția locurilor de puncție

Sterilizarea prin agenți chimici

Folosește diferite substanțe, care, prin însușirile lor fizico-chimice, au un efect nociv asupra microorganismelor, ducînd la distrugerea lor după perioade variabile de contact.

Unele substanțe antimicrobiene sînt utilizate pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor într-un mediu de cultură sau lichid biologic, sau pentru distrugerea completă a lor (în primul caz e vorba de acțiune bacteriostatică și se obține prin doze reduse, iar în cel de al doilea — acțiune bactericidă și se obține prin doze mari).

Substanțele chimice antimicrobiene au capacitatea de a fi selective în sensul că pot exercita o acțiune bactericidă pentru unii germeni, bacteriostatică sau indiferentă pentru alții.

În compoziția unor medii de cultură selective sînt înglobate substanțe ca verde de malahit, verde briliant, cristal violet, roșu de Congo, care inhibă creșterea unor specii bacteriene, favorizînd dezvoltarea altora.

Pentru distrugerea germenilor în mediul înconjurător, substanțele chimice cele mai frecvent folosite sînt cele prezentate în tabelul 1.

Tehnica recoltării, ambalării și transportului materialelor patologice pentru examene de laborator

Materialele patologice care servesc pentru diagnosticul de laborator al diferitelor stări de boală la animale sînt foarte diferite în funcție de natura bolii, de faza evolutivă în care se află, în funcție de starea animalului de la care provin și de posibilitățile materiale de examinare. Medicul veterinar, atît cel de laborator, cît și practicianul, trebuie să cunoască temeinic ce fel de materiale patologice se pretează pentru diagnosticul fiecărei entități morbide, alegînd întotdeauna pe acelea care oferă în cea mai mare măsură șansa de a stabili un diagnostic real, precis și cît mai precoce. Pentru medicul de laborator sînt imperios necesare aceste cunoștințe, pentru a fi capabil să se adreseze în cursul examenelor ce le efectuează, materialelor care sînt cele mai indicate și care-i permit să ajungă la o concluzie într-un timp cît mai scurt. Pentru medicul practician este necesar să cunoască aceste probleme pentru a trimite spre examinare materialele cele mai adecvate și în condiții adecvate, care să permită efectuarea probelor de laborator în vederea precizării diagnosticului.

În funcție de examenele care se efectuează se trimit la laborator materialele arătate în continuare.

1. Pentru examenul bacterioscopic și bacteriologic.

Sîngele se pretează pentru aceste examene sub formă de frotiuri sau ca atare. Frotiurile se vor efectua întocmai ca în cazul examenului hematologic, pe lame obișnuite de microscop. După uscare, dacă e nevoie să fie transportate, se va avea grija ca suprafețele lamelor să nu vină în contact între ele (se pun în cutii separate, sau se izolează una de alta cu ajutorul unor bețe de chibrit sau cu hîrtie).

Pentru hemocultură, se recoltează prin puncție venoasă, după prealabila asepsie, 5—10 ml sînge, în funcție de specie și talia animalului, în eprubete sau sticlute sterile. Dacă sînt mai multe probe, ele se vor individualiza prin numerotare. Transportul pentru lucrările de însămînțare se va face cît mai urgent.

Lichidul cefalorahidian se va recolta cu ace de seringă sterile în eprubete de asemenea sterile, pe un anticoagulant (de exemplu heparină).

Urina se recoltează în recipiente sterile. De la femelă este preferabilă recoltarea prin cateterism, în acest fel evitîndu-se ca germenii de pe căile urinare să falsifice rezultatele examenului. Urocultura este de



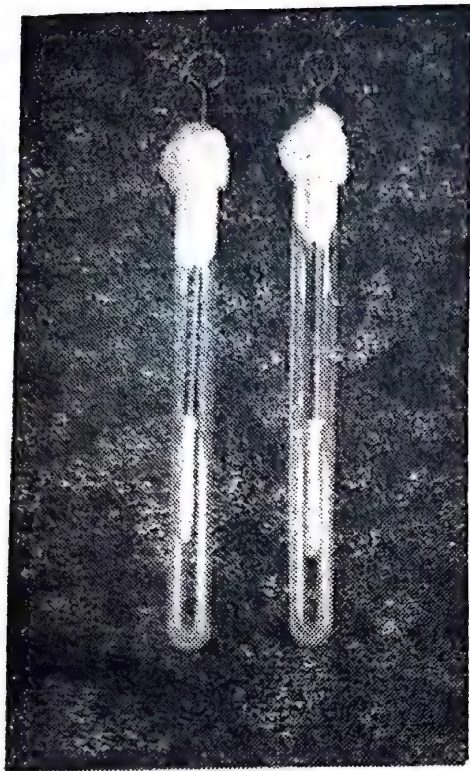


Fig. 10 — Tampoane sterile pentru recoltarea de secreții patologice

dorit să se practice și ea cât mai precoce după recoltare.

Secrețiile (oculare, nazale, vaginale etc.) se vor recolta cu tampoane sterile pregătite în prealabil, special în acest scop. Ele sînt fixate pe baghete de sticlă sau metal, care, la rîndul lor, sînt introduse în eprubete de mărime corespunzătoare și sterilizate prin autoclavare.

Lichidele patologice de puncție se vor recolta întocmai ca singele, în eprubete sau recipiente sterilizate.

Organele se vor trimite de preferință întregi sau fără a fi scoase din cadavrul respectiv, pentru ca operațiunile de înșămîntare să se poată face în condiții cît mai bune. Se înțelege că și în acest caz transportul trebuie să se facă în condiții cît mai bune și rapid, pentru ca înșămîntările să fie făcute înainte de invadarea cadavrului de germenii saprofiți intestinali. Cel mai bun lucru este să se trimită (în cazul animalelor mici și mijlocii) animalele în stare preagonică, fapt care permite recoltarea tuturor probelor necesare, în condiții optime. Dacă nu este posibil acest lu-

cru, se vor recolta, cu instrumente sterilizate prin flambare, porțiuni de organe care se vor trimite în recipiente sterilizate, pentru înșămîntări.

Laptele se va recolta în eprubete sterile, avîndu-se grijă să se în-lătore primele picături de pe canalul galactofor, acestea conținînd germeni ajunși aici din mediul extern, prin orificiul papilar.

2. Pentru examenele virusologice se pot recolta materiale patologice diferite, în funcție de entitatea morbidă în cauză: sînge (numai în faza de viremie), secreții (mai ales în bolile respiratorii, cum sînt rinotraheita bovinelor, parainfluența bovinelor, adenoviroze etc.), fecale (infecții cu enterovirusuri, adenovirusuri, virusul diareei virotice a bovinelor, virusul gastroenteritei infecțioase a porcinelor etc.), organe (turbare, boala lui Aujeszky, hepatita virotică a cîinilor, leucoza aviară etc.), lichidele veziculare (febra aftoasă, exantemul veziculos al porcului), epiteliile mucoase sau cutanate (febra aftoasă, exantemul veziculos), cruste cutanate (variole). Esențialul este însă ca ele să fie prelucrate cît mai precoce după recoltare. Dacă este necesar transportul, acesta se va face numai în termose cu gheață și în recipiente sterile, pentru a evita contaminarea cu germeni bacterieni. Congelarea constituie un mijloc și mai eficient. Se poate recurge și la trimiterea acestor produse patologice în ser fiziologic glicerinat 50% neutru și steril, care conservă majoritatea virusurilor.

3. Pentru examenul histopatologic se va recurge la recoltarea materialelor cît mai repede după moartea sau sacrificarea animalelor. Aceasta din cauza rapidității cu care se instalează fenomenele aterative post-

mortale. În unele cazuri se procedează la recoltarea prin biopuncție sau prin biopsie.

Recoltarea se face direct în soluția fixatoare (de obicei formol 10%; în cazul turbării în acetonă), în borcănase care au pe fund o rondelă de hîrtie de filtru sau vată, menită să împiedice aderența pieselor la fundul borcanului și să asigure procesul de fixare, din toate părțile. Bucățile de organe recoltate nu vor trebui să fie mai groase de 5 mm pentru ca fixatorul să pătrundă în profunzime. Este deosebit de important a se recolta cele mai adecvate țesuturi pentru diagnosticul urmărit. Cunoșcînd localizarea leziunilor cu cea mai mare valoare diagnostică, vor fi recoltate acele organe în care acestea se găsesc cel mai frecvent. Așa de exemplu, pentru diagnosticul turbării se vor recolta porțiuni din sistemul nervos central și anume cornul lui Amon, scoarța cerebrală și cerebel, pentru diagnosticul laringotraheitei infecțioase a păsărilor se vor recolta porțiuni de mucoasă traheală, pentru diagnosticul histopatologic al variolei porțiuni cutanate sau de mucoasă cu leziuni, pentru diagnosticul anemiei infecțioase a calului porțiuni de ficat etc. Este de asemenea necesar să se recolteze segmente de organe cuprinzînd atît porțiuni modificate cît și țesut sănătos pentru ca, în preparatele ce rezultă, să se poată face comparația între țesuturile afectate și cele normale.

4. Pentru examenul hematologic recoltarea sîngelui se face după tehnici și locuri de elecție variabile, în funcție de specie. Ca principiu general, după asigurarea contenției, se procedează la efectuarea toaletei locului de elecție, care constă în tunderea sau raderea părului urmată de dezinfectia locului cu un tampon imbibat în alcool-eter. Se așteaptă pînă cînd locul este perfect uscat și numai după aceea se face punționarea sau secționarea.

Pentru punționare și secționare se vor folosi instrumente sterilizate și perfect uscate (ace de seringă, lanțete Franke, foarfeci, bisturie etc.). Nu se va folosi același instrumentar pentru recoltarea sîngelui de la mai multe animale, succesiv, atît pentru a evita erorile de determinare, cît și pentru a evita transmiterea în serie a unor boli.

De la speciile mari (bovine, cabaline, ovine) sîngele poate fi prelevat prin punționarea venei jugulare, cînd e vorba de cantități mai mari, sau a venei angulare a ochiului, venei auriculare medii, a suprafeței interne a buzelor precum și prin secționarea marginii pavilionului urechii, a pielii de la baza cozii, cînd e vorba de cantități mici.

De la porc, sîngele poate fi recoltat prin punția confluenței jugularelor, a venelor mari auriculare, prin secționarea marginilor conchiei auriculare și prin amputarea vîrfului cozii.

De la cîine se poate recolta sînge din jugulare, venele ulnare sau safene, prin secționarea marginilor conchiei auriculare.

De la pisici, iepuri, cobai se recoltează sînge prin secționarea marginilor urechii, punția venelor auriculare sau punția cardiacă.

La șobolani și șoareci, se practică în mod obișnuit secționarea vîrfului cozii sau a arterei femurale.

Recoltarea sîngelui de la iepure, cobai, șoareci și șobolani, se mai poate face și din sinusul orbital, după metoda inițiată de Halpern



(1954). Se conționează în așa fel animalul încît să se realizeze și staza vaselor submaxilare după care, cu ajutorul unui tub capilar de sticlă, avînd diametrul exterior de 1—1,2 mm, iar cel interior de 0,6—0,8 mm sau a unei pipete de sticlă bine efilată, care se introduc sub pleoapa a 3-a, orientate ușor oblic, spre planul sagital al capului, se pătrunde în sinusul orbital, pe o adîncime de cca 1 cm. Sîngele care se scurge în jet continuu sau în picătură prin lumenul capilarului de sticlă, se va colecta într-un recipient cu anticoagulant. Metoda este practică, relativ comodă și nu presupune riscuri (hemoragii ulterioare).

De la păsări, sîngele se poate recolta prin secționarea crestei, bărbîțelor sau a membranei interdigitale (la palmipede), prin puncționarea venei ulnare sau a arterei brahiale, pe marginea anterioară a aripii, sau prin puncție cardiacă.

Indiferent de locul și modalitatea de prelevare a sîngelui, trebuie avut grijă să nu se traumatizeze zona de elecție, să se evite pe cît posibil stressarea animalelor prin conțenții brutale, puncționări repetate etc. pentru a reduce la minimum modificarea unor parametri hematologici. Cantitatea de sînge ce se va recolta depinde de numărul și felul examenelor hematologice care urmează să se efectueze.

Dacă sîngele trebuie transportat la laborator în vederea efectuării diferitelor examene sau dacă natura acestora impune folosirea sîngelui necoagulat, recoltarea acestuia se va face pe un anticoagulant.

Dintre substanțele anticoagulante cu cea mai mare utilizare fac parte:

EDTA (acidul etilendiaminotetraacetic) cunoscut în comerț sub diferite denumiri — Versen, Titriplex, Sequestren, Komplexon III etc. — este unul dintre cei mai buni anticoagulanți pentru faptul că nu produce modificări ale sîngelui nici după un contact prelungit (cîteva zile), cu condiția menținerii probelor la o temperatură scăzută (5°C). Dintre numeroasele săruri pe care le formează, se pare că cele mai multe calități le întrunește sarea dipotasică (K_2EDTA) care conservă perfect morfologia celulelor sanguine. Se fac soluții în ser fiziologic sau apă distilată, în concentrații diferite (1%, 5%, 10%). Recipientele cu anticoagulant pot fi pregătite din timp și păstrate vreme îndelungată fără ca anticoagulantul să se altereze, după cum urmează:

K_2EDTA	1,0 g
Ser fiziologic 0,85%	100,0 ml

Din această soluție se repartizează în fiecare recipient (eprubete, sticlute de penicilină etc.), cîte 0,2 ml lăsîndu-se apoi la temperatura camerei ca apa să se evapore. Cantitatea de reziduu anticoagulant uscat rămas în eprubetă, după evaporarea apei, este suficientă pentru a face necoagulabili 2 ml de sînge. În general proporția de EDTA utilizat în acest scop este de 0,5—1,0 mg/ml sînge. Este indicat să se folosească EDTA pentru oricare test hematologic, inclusiv pentru examenul morfologic al sîngelui.

Amestecul de oxalați (Wintrobe). Întrucît folosirea individuală, a unuia sau altuia din oxalați, determină modificări ale unor componente sanguine, fie sub aspect cantitativ, fie calitativ, afectînd în consecință

rezultatele examenului hematologic, s-a convenit asupra utilizării unui amestec de oxalați, care se poate obține din:

— Oxalat de potasiu	0,8 g
— Oxalat de amoniu	1,2 g
— Apă distilată	100,0 ml

Din acest amestec se utilizează 0,1 ml pentru fiecare 1 ml sînge. Amestecul se repartizează în recipiente în cantitate de 0,2 ml sau 0,5 ml (respectiv pentru 2 și 5 ml sînge), lăsîndu-se la temperatura camerei, eventual la termostat la 37°C (nu sînt indicate temperaturi mai mari cîci substanțele din amestec se descompun), pînă cînd apa se evaporă complet, rămînînd numai o pulbere albă. Recipientele astfel pregătite, se astupă cu dopuri de cauciuc și pot fi păstrate timp îndelungat.

Deși amestecul de oxalați (Wintrobe) întrunește calități superioare față de fiecare oxalat în parte, el are totuși dezavantajul că nu poate fi utilizat cu bune rezultate pentru studiile de morfologie a sîngelui, întrucît produce modificări ale celulelor sanguine (vacuolizări, picnoze, aglutinarea trombocitelor etc.), fiind, din acest punct de vedere, inferior EDTA-ului. Se poate folosi însă cu rezultate eficiente în determinarea VEM, VSH, hemoglobinei, numărătoarea globulelor roșii și albe.

Heparina este un anticoagulant natural. Se poate folosi în concentrație de 0,1—0,2 mg/ml sînge pentru anumite determinări hematologice, dar nu și pentru examenul morfologic al sîngelui, pentru aceleași considerente pe care le-am menționat la oxalați. La ora actuală, atît oxalații cît și heparina tind a fi înlocuiți cu EDTA.

Rezultă, din cele prezentate, că alegerea tipului și proporției de anticoagulant trebuie făcută cu grijă, în raport cu testul care urmează a fi executat și nu la întîmplare, pentru a putea conta pe rezultate cît mai corecte.

5. Pentru examenele serologice se va recolta sînge în eprubete sau sticlute sterile, în cantități variabile în funcție de specie (10 ml la animale mari, 1—2 ml la păsări), avîndu-se grija de a se numerota cu atenție tuburile și de a se identifica animalele de la care provin probele. După recoltare, sîngele se va lăsa la temperatura camerei timp de 30—60 minute, pentru a se coagula, după care se va face decolarea cheagului de pe pereții tuburilor, cu ajutorul unor baghete de sticlă sterile sau a unor anse de sîrmă flambate după fiecare probă. Apoi probele se pun la frigider pentru retractarea cheagului și pentru o mai bună exprimare a serului; serul astfel exprimat se poate folosi în reacțiile serologice.

6. Pentru examenele micologice recoltarea se face conform indicațiilor de la capitolul „Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micozelor”.

7. Pentru examene biochimice ale sîngelui se vor respecta aceleași principii de recoltare ca cele de la examenul serologic. Pentru glicemie recoltarea se va face pe fluorură de sodiu (cîteva cristale), pentru a preveni glicoliza.



Examenul microscopic

Urmărește punerea în evidență a agenților animați (bacterieni, parazitari) prin examinarea la microscop a frotiurilor sau a preparatelor, ca atare, sau colorate prin diferite metode. Pentru aceasta se folosesc diferite produse:

Sîngele se pretează pentru punerea în evidență a germenilor patogeni în bolile care evoluează cu septicemie. În cursul multiplicării, ei sînt vehiculați de torentul circulator în toate țesuturile. De obicei este vorba de infecții cu evoluție acută sau supraacută și mult mai rar de cele subacute și cronice, caz în care germenii se găsesc în sînge pentru perioade scurte, numai în anumite faze. În stări de bacteriemie, traduse prin prezența temporară a germenilor eliberați din focare latente de infecție și care nu se însoțesc de manifestări clinice, proporția lor în sînge este scăzută.

Cele mai frecvente boli în care germenii pot fi găsiți și decelați în sînge sînt: antraxul septicemic, pasteureloza, salmoneloza și colibaciloza septicemică, precum și parazitozele endoglobulare (babesioza, babesieloza și anaplasmoza la taurine și ovine, babesioza și nutalioza la cabaline etc.). Momentul optim pentru decelarea acestor agenți este perioada de pirexie, cînd febra este maximă sau, dacă este posibil, chiar înaintea unui frison.

Frotiurile din sînge se fac de la animalele în viață sau, mai rar, după moarte. Grija care trebuie avută în ambele cazuri este aceea de a evita răspîndirea în mediul înconjurător a singelui și deci, crearea de surse de infecție pentru alte animale. Se vor efectua frotiuri subțiri, uniforme, care se vor colora apoi prin metoda Gram sau Giemsa și se vor examina cu obiectivul de imersie.

Lichidul cefalorahidian oferă date orientative prețioase în infecțiile acute și cronice septice ale meningelor (stafilococice, streptococice, leptospirice, colibacilare, tuberculoase etc.). În acest scop se vor efectua 3 frotiuri din sedimentul lichidului (sedimentul spontan sau de centrifugare) care se colorează prin metoda Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen. Streptococii hemolitici vor apărea sub formă de coci, Gram pozitivi, izolați, perechi sau în lanțuri scurte, și se pot foarte greu diferenția de stafilococi, fiind necesară diferențierea culturală. Stafilococii apar de obicei în grămezi. În meningitele tuberculoase vor apărea acidorezistenți cu morfologie caracteristică, în frotiurile colorate prin metoda Ziehl.

Laptele dă indicii asupra eventualelor procese inflamatorii ale glandei mamare, atât prin modificările însușirilor sale fizico-chimice, cât și prin flora bacteriană ce poate fi pusă în evidență în sediment. În acest scop, se va centrifuga din laptele suspect o cantitate suficientă (10—20 ml), iar din sediment se vor face frotiuri care vor fi colorate după o prealabilă degresare în eter, cu metodele obișnuite (Gram, Giemsa, Ziehl) în funcție de suspiciune. Prin acest mijloc se poate preciza diagnosticul mamitelor stafilococice, streptococice, tuberculoase (la vacă), gangrenoase (la oaie).

Secrețiile genitale constituie substratul pentru diagnosticul bacterioscopic în procesele inflamatorii de la nivelul căilor genitale și în special de la nivelul endometriului. În avortul produs de chlamydii la oi de exemplu, se vor face frotiuri prin amprentă din mai mulți carunculi placentari, din mucusul de la suprafața avortonului și din pulmonul sau conținutul acestuia (din acestea din urmă șansele sînt mai reduse), iar după fixare se vor colora prin metoda Stamp și se vor examina cu obiectivul de imersie pentru evidențierea corpusculilor elementari. Aceștia prin metoda amintită apar colorați în roșu-aprins în timp ce restul bacteriilor se colorează în verde, albastru sau violet. Se poate face și colorarea prin metoda Macchia-vello în același scop.

În bruceloză, frotiuri făcute din carunculi placentari, din conținutul cheagului avortonului, scurgerile loșiale ale vacii care a avortat, din sperma taurilor suspecti, colorate prin metode electivă (Kozlovski, Köster) pot pune în evidență germeni izolați, grupați sau înglobați în celule fagocitare, colorați în roșu, care contrastează cu restul elementelor celulare.

Pentru alte tipuri de infecții, punerea în evidență, în frotiuri, a germeilor în cauză presupune utilizarea metodelor curente. Așa de pildă, în salpingitele și metritele de natură tuberculoasă, în secrețiile genitale se vor putea pune în evidență germenii acidorezistenți, liberi sau înglobați, cu o morfologie caracteristică.

Secrețiile purulente pot fi examinate la microscop în suspiciuni de actinomicoză, actinobaciloză, gurmă, limfadenită cazeoasă, dermatită nodulară etc. În aceste cazuri se va prefera prelevarea de materii purulente din formațiuni specifice, nedeschise (chiști, formațiuni pe cale de abcedare) în care nu au intervenit alți germeni de infecție secundară. În acest scop, se va face toaleta și dezinfecția locală, urmată de puncția și extragerea de lichid purulent, din care se vor face frotiuri și se vor colora adecvat. În cazul actinomicozei și actinobacilozei se va recolta puroiul într-o eprubetă și se va agita cu o soluție de carbonat de sodiu, pentru dizolvarea mucusului, apoi se toarnă conținutul într-o placă Petri pentru separarea granulelor formate de tufele actinomicotice și actinobacilare caracteristice. Se iau apoi 1—2 asemenea formațiuni, se pun între două lame și se presează ușor, după care se examinează direct la microscop sau se colorează prin metoda Gram. *Actinomyces bovis* va apărea sub formă de filamente Gram pozitive, fine, ramificate.

În actinobaciloză se vor pune în evidență tufe caracteristice în rozetă, de dimensiuni mici.

În dermatita nodulară, pe frotiuri practicate din conținutul purulent al nodulilor dermici se pot pune în evidență, după colorarea prin metoda Ziehl—Neelsen, germeni acidorezistenți, în număr redus, izolați, mai rar fagocitați.

În limfadenita cazeoasă a oii prezența, în frotiurile practicate din ganglionii afectați și colorate prin metoda Gram, a unor bacili fini, polimorfi, Gram pozitivi izolați sau în grămezi confirmă diagnosticul.

Urina constituie un material, care supus examenului bacterioscopic furnizează în puține cazuri date importante, dată fiind posibilitatea contaminării ei pe traiectul căilor urinare.

În vederea examinării pe lingă recoltarea în condiții de asepsie pe cât posibil mai riguroase, se impune a se face o centrifugare și din sediment, practicarea unor frotiuri, și colorarea lor după metodele uzuale. Trebuie specificat că prezența germenilor acidorezistenți, mai ales când aceștia sînt în număr redus, trebuie interpretată cu prudență, deoarece la nivelul căilor urinare se găsesc uneori și micobacterii nepatogene (mai ales *M. smegmatis*) care sînt saprofite ale mucoaselor genitale.

În cazul leptospirozei, se poate decela prezența leptospirelor în urină în cea de a doua fază a bolii — leptospiruria. În acest scop se folosește numai urina foarte proaspătă, leptospirele lizîndu-se destul de repede în pH-ul acid al urinei. După centrifugarea urinei se examinează sedimentul între lamă și lamelă direct, necolorat, în câmp întunecat și mai rar după o colorare corespunzătoare.

Fecalele se pretează mai puțin pentru acest examen, dat fiind polimorfismul florei bacteriene care le populează. Totuși, în unele boli se folosește cu rezultate bune. Astfel, în enterita paratuberculoasă a bovinelor, frotiuri efectuate din materii fecale diareice sau, mai bine, din fecalele cu mult mucus și epiteliile intestinale, permit punerea în evidență a agenților etiologici, fapt care, alături de semnele clinico-epizootologice concurează la precizarea diagnosticului. Trebuie menționat însă că, datorită periodicității cu care se elimină germenii în acest caz, este necesar ca asemenea examene să se repete la interval de cîteva zile. În perioadele cînd eliminarea lor este activă, ei pot fi observați cu ușurință, datorită numărului lor mare și dispoziției în grămezi.

Mai ușor de decelat în fecale sînt bacilii tuberculozei aviare, ei eliminîndu-se în cantități imense, mai ales cînd există și localizări intestinale, dar și în cele hepatice, cînd ei sînt deversați în lumenul intestinului pe cale biliară. În acest caz, se face un frotiu fie direct din materiile fecale, fie, preferabil, din sedimentul de centrifugare obținut din filtratul (prin vată sau tifon) suspensiei de materii fecale. Această din urmă soluție are avantajul că permite concentrarea materialului de examinat dintr-o cantitate mai mare de fecale, rezultatele fiind mai sigure. Pentru aceasta se recoltează materiile fecale de la păsările suspecte, se suspensionează și omogenizează bine în ser fiziologic, după care se filtrează prin vată sau chiar prin hîrtie de filtru, pentru a obține un lichid debarasat de materiile alimentare. Filtratul se supune centrifugării, 10 minute la 3000 t/minut și din sediment se fac frotiuri care apoi se colorează prin metoda Ziehl—Neelsen.

În disenteria porcului, produsă de *Treponema hyodysenteriae*, preparate efectuate din fecalele porcilor bolnavi sau, în cazul cadavrelor, din raclatele de mucoasă de la nivelul colonului spiralat, examinate direct, sau, preferabil după colorarea prin metoda Tribondeau—Fontana, permit evidențierea agentului etiologic.

De asemenea, în cazul disenteriei produsă de *Vibrio coli*, la aceeași specie, preparate din fecale sau raclatele de mucoasă de la nivelul ileonului, examinate după o prealabilă colorare negativă, permit observarea vibriunilor cu aspect curbat, în formă de virgulă sau în S.

Tehnica efectuării frotiurilor

Frotiul este un preparat expeditiv, efectuat din diferite produse patologice (sînge, lichide patologice, organe etc.), sau din culturi ale diferiților germeni, preparat care permite punerea în evidență a formațiunilor celulare și cercetarea însușirilor lor morfologice și tinctoriale.

Tehnica efectuării frotiurilor diferă în funcție de materialul din care se practică și de natura germenilor în cauză.

Din lichide frotiurile se realizează prin întinderea materialului respectiv în strat subțire, cu ajutorul unei anse bacteriologice sau a unei lame șlefuite, pe lame de microscop obișnuite. Pelicula de material patologic este recomandabil să fie cît mai fină și să aibă o întindere mai redusă decît marginile lamei de microscop. Dacă se presupune că lichidul respectiv conține o cantitate redusă de elemente celulare, se poate realiza o concentrare a acestora prin centrifugare, frotiul practicîndu-se din sediment.

Dacă este vorba de frotiuri ce se practică din culturi, în cazul mediilor lichide, frotiul se face cu ansa bacteriologică, sau cu pipeta Pasteur, direct din mediul de cultură, iar în cazul mediilor solide se face prelevarea cu ansa bacteriologică a unei cantități reduse de cultură care se emulsionează bine într-o picătură de apă distilată, pusă în prealabil pe o lamă de microscop bine degresată și apoi se întinde suspensia în strat subțire.

În cazul culturilor în medii solidificate în poziție verticală (de exemplu geloza Veillon) se recurge la o pipetă Pasteur la care se adaptează un tub de cauciuc, în așa fel ca el să permită manipularea pipetei în profunzimea mediului sub control vizual. Materialul microbial se recoltează prin aspirarea coloniilor izolate, care se găsesc în diferite puncte ale mediului.

— *Din organe*, frotiul se poate realiza în mod diferit în funcție de natura acestora. Cel mai frecvent se face prin aplicarea unei lame de microscop pe suprafața de secțiune a organului de cercetat, în acest fel rămînînd o impresiune corespunzătoare formei suprafeței atinse (metoda prin amprentă). Este bine ca pe aceeași lamă să se practice mai multe asemenea amprente, pentru a se putea examina frotiurile mai subțiri (ultimele amprente sînt întotdeauna mai fine).

Se poate recurge, de asemenea, la glisarea unei porțiuni de organ, tăiată geometric, pe suprafața unei lame de microscop, avîndu-se grija de a nu se atinge marginile lamei. Și în acest caz se preferă frotiurile cît mai fine.

Uneori, frotiurile se execută prin strivirea între două lame (în cazul leziunilor de tip nodular, cum sînt cele din tuberculoză). În acest scop, se depune o formațiune nodulară suspectă pe o lamă și cu o a doua se strivește prin compresiune.

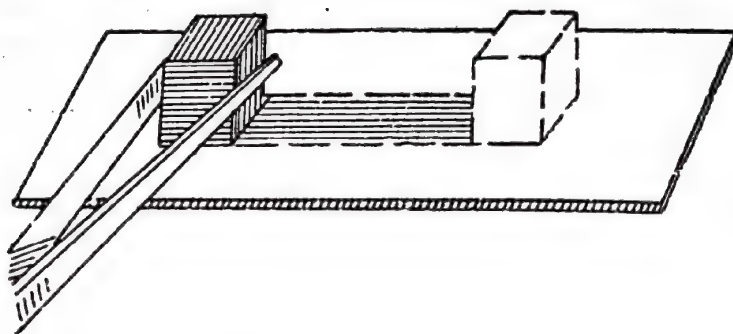


Fig. 11 — Efectuarea frotiului din organe

În cazul unor organe bogate în lichide (sînge, exsudate) frotiul se poate face prin depunerea cu ajutorul unei anse bacteriologice sau a unei pipete Pasteur pe lama de microscop a unei cantități reduse de material patologic și etalarea lui în strat subțire.

Frotiurile astfel obținute se fixează după uscare la flacără și se colorează. Fixarea este necesară pentru a realiza o bună aderență a materialului patologic pe lamă și implicit evitarea desprinderii de către soluțiile colorante a materialului de examinat pe de o parte și inactivarea germenilor etalați pe de alta. Fixarea se poate obține prin mijloace termice sau chimice.

Fixarea termică presupune trecerea frotiului uscat de 3—4 ori prin flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi cu alcool, avînd grija ca lama să fie orientată spre flacăra cu partea opusă celei pe care s-a etalat materialul. Viteza de trecere este moderată, în așa fel ca în final temperatura lamei să fie în jur de 60°C.

Fixarea termică se poate face și prin flambare, punînd pe frotiu cîteva picături de alcool etilic, metilic sau alcool-acetonă (din bateria de colorare Gram) și dîndu-li-se foc imediat după scurgerea excesului de alcool.

Fixarea chimică se realizează prin folosirea unor substanțe fixatoare (alcool etilic, amestec de alcool etilic, eter și alcool metilic). Acestea se pun în cantitate suficientă pentru a acoperi pelicula de material de pe lamă și se lasă pînă la evaporarea totală.

Trebuie menționat că unii coloranți (de exemplu soluția Giemsa din metoda cu același nume sau soluția Ruge din metoda Tribondeau—Fontana) au și capacitatea de a fixa frotiurile, așa încît în acest caz nu mai este necesară fixarea prealabilă.

După fixarea și răcirea frotiului urmează colorarea, care este bine să se facă cît mai curînd după efectuarea frotiurilor.

Metodele cele mai importante de colorare pentru examenul bacteriologic

Prin colorare se pot stabili unele particularități morfologice ale germenilor (dimensiuni, formă, afinități tinctoriale) ca și relațiile cu țesuturile în care se află, facilitîndu-se în acest fel precizarea diagnosticului.

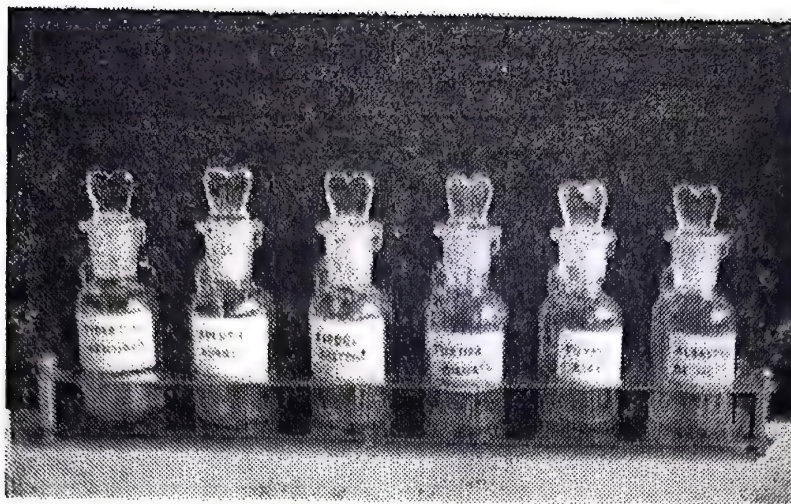


Fig. 12 — Baterie de colorare

Metodele de colorare sînt diverse și se aplică în mod diferențiat, în funcție de scopul urmărit. Există metode care se aplică în mod curent și metode speciale, mai pretențioase și aplicate numai în anumite situații.

Colorația Gram se folosește pentru diferențierea germenilor Gram pozitivi de cei Gram negativi din frotiurile efectuate din diferite țesuturi sau din culturi microbiene. Este o metodă de bază în practica bacteriologică. Ea constă în:

- colorare cu soluție de violet de Gentiana 10% timp de 1 minut
- vărsarea colorantului de pe lamă
- tratarea frotiului cu soluție Lugol timp de 2 minute
- decolorarea cu amestec de alcool-acetonă (āā) pînă cînd amestecul ce se scurge de pe lamă nu mai este colorat
- spălare cu apă de robinet
- recolorare cu fucsină diluată 1/10 timp de 20—30 secunde
- spălare cu apă de robinet
- uscare
- examinarea la microscop.

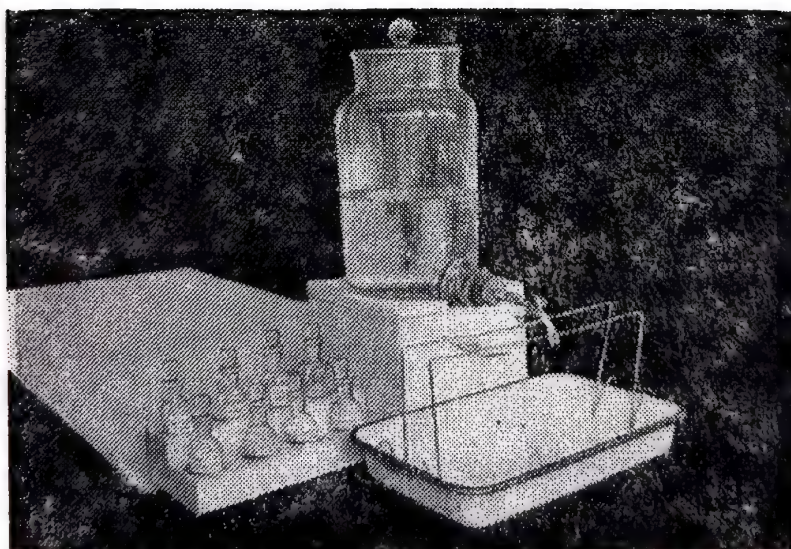


Fig. 13 — Baterie de colorare a frotiurilor

Germenii Gram pozitivi vor apărea colorați în albastru-violet iar cei Gram negativi în roșu. Această diferență de colorare rezultă din faptul că germenii Gram pozitivi fixează violetul de Gentiana în așa fel încât prin tratarea cu soluția de alcool-acetonă nu se decolorează, în timp ce cei Gram negativi se decolorează și apar ca urmare colorați în roșu cu cel de al doilea colorant (fucsina diluată). Sporii bacterieni apar sub formă de vacuole.

Colorația cu albastru de metilen (Löffler). Se folosește pentru punerea în evidență a germenilor într-un material patologic, fără a-i diferenția sub raportul afinității lor tinctoriale.

În acest scop se acoperă frotiul fixat cu o soluție de albastru de metilen 3‰ și, după 2—5 minute, se spală cu apă, se usucă, se examinează. Germenii vor apărea colorați în albastru, uniform. Metoda permite și observarea unor particularități morfologice cum ar fi prezența capsulei și sporului. Capsula se colorează în roz-pal, iar sporul apare sub forma unei vacuole.

Colorația Ziehl—Neelsen. Se folosește pentru punerea în evidență a germenilor acidorezistenți, care nu se colorează prin metodele obișnuite (mai ales micobacteriile):

- acoperirea frotiului, în prealabil fixat la flacără, cu soluție de fucsină Ziehl

- încălzirea la flacără pînă la apariția vaporilor și menținerea prin încălziri repetate timp de 5—10 minute (se va avea grijă ca soluția colorantă să nu fiarbă și să se completeze în caz că s-a evaporat de pe anumite porțiuni de frotiu)

- vărsarea colorantului

- decolorarea cu o soluție de acid sulfuric 1/4 sau acetic 1/3, timp de cca 2 minute

- spălare cu apă

- tratare cu alcool absolut timp de 5 minute

- spălare cu apă

- recolorare cu soluție de albastru de metilen 1‰ timp de 2—3 minute

- spălare cu apă

- uscare și examinare cu imersie.

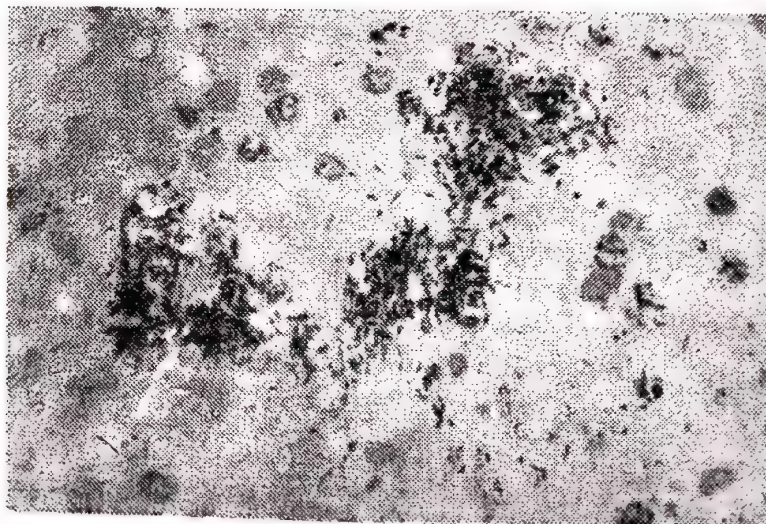


Fig. 14 — Bacili tbc în frotiu din organe cu leziuni

La examenul frotiurilor, germenii se pot prezenta colorați în roșu (acidorezistenți) sau în albastru (neacidorezistenți). Primii fixează fucsina Ziehl și nu se decolorează sub acțiunea acidului, în timp ce secunzii se decolorează sub influența tratării cu acid. Acidorezistența rezidă în structura chimică particulară a peretelui celular al germenilor, în sensul că în cazul acidorezistenților acesta fiind bogat în substanțe lipoide împiedică pătrunderea acidului decolorant ca de altfel și a coloranților (fucsina pătrunde datorită concentrației ridicate și a căldurii). Pentru acest motiv, germenii acidorezistenți nu sînt colorabili prin metode obișnuite.

Colorația Ziehl—Neelsen modificată, în vederea diferențierii micobacteriilor patogene de cele saprofite:

- colorare cu fucsină Ziehl, prin încălzire repetată, pînă la apariția vaporilor, timp de 5—10 minute

- vărsarea colorantului de pe lamă

- decolorarea cu acid sulfuric 1% cca 2 minute

- spălare cu apă

- tratare cu alcool absolut timp de 5 minute

- spălare cu apă

- colorare cu soluție de violet de Gențiana 1%, timp de 30 secunde

- tratare cu soluție Lugol timp de 30 secunde

- clătire în alcool etilic 96°, de mai multe ori, pînă cînd lichidul ce se scurge de pe frotiu nu mai conține colorant

- colorare cu soluție de verde de malahit 2%, timp de 10 secunde

- clătire, uscare, examinare.

Micobacteriile patogene apar colorate în roșu, în timp ce cele nepatogene vor fi colorate în violaceu.

Colorația Köster. Se folosește pentru colorarea brucelelor:

- fixarea frotiurilor la flacără

- colorarea timp de 1 minut cu soluție alcalină de safranină preparată ex tempore din 5 picături soluție apoasă 3% de safranină și 1,5 ml soluție de KOH 5,6%

- spălare cu apă de robinet

- diferențierea cu soluție de acid sulfuric 0,05% timp de 15 secunde

- spălare cu apă de robinet

- recolorare cu albastru de metilen 3% timp de 15 secunde

- spălare, uscare, examinare.

Prin această metodă electivă, dar nu specifică, brucelele vor apărea colorate în roșu, în timp ce restul elementelor celulare și bacteriene, cu excepția acidorezistenților, în albastru.

Metoda Koslovski. Se folosește pentru colorarea brucelelor:

- frotiul fixat se acoperă cu o soluție apoasă 2% safranină și se încălzește pînă la apariția vaporilor; se menține timp de 1 minut la această temperatură;

- spălare cu apă

- recolorare cu soluție apoasă 1% de verde de malahit sau verde brillant

- spălare cu apă

- uscare, examinarea la obiectivul cu imersie.

Brucelele vor apărea colorate în roz în timp ce alți germeni în verde.

Metoda selectivă recomandată de O.M.S. pentru colorarea brucelelor. Este folosită în special pentru punerea în evidență a brucelelor în materialele patologice:

- colorare cu soluție de fucsină diluată 1/10 timp de 1 minut
- diferențierea cu soluție de acid acetic 0,5% timp de 30 secunde
- spălare cu apă distilată prin acoperirea frotiului timp de 1—3 minute
- colorare cu soluție de albastru de metilen 1% timp de 30 secunde
- spălare cu apă distilată
- uscare, examinare la obiectivul cu imersie.

Germenii din genul *Brucella* apar colorați în roșu aprins, iar cei aparținând altor genuri se colorează în albastru.

Metoda Tribondeau—Fontana. Se folosește pentru colorarea leptospirelor și constă în impregnarea argentică. Sînt necesare trei soluții:

- Soluția Ruge:
 - formol 2,0 ml
 - acid acetic glacial 1,0 ml
 - apă distilată 100,0 ml
- Soluția mordantă:
 - acid tanic 5,0 g
 - fenol 1,0 g
 - apă distilată 100,0 ml
- Soluția argentică Fontana:
 - azotat de argint 5,0 g
 - apă distilată 100,0 ml

La 80 ml din soluția argentică Fontana se adaugă picătură cu picătură soluție concentrată de amoniac. Se formează un precipitat brun, dens. Se adaugă amoniac în continuare pînă ce precipitatul se dizolvă și amestecul devine limpede. La acest amestec se adaugă, tot picătură cu picătură, soluție de azotat de argint 5%, pînă cînd devine ușor opalescent. Astfel pregătită, soluția poate fi păstrată 1—2 luni.

Tehnica de colorare:

- frotiul, uscat, se acoperă cu soluția Ruge (fixare) timp de 5 minute; se repetă fixarea de 2—3 ori
- spălare cu alcool
- se acoperă lama cu soluția mordantă și se încălzește pînă la apariția vaporilor
- spălare cu apă
- se acoperă frotiul cu soluție argentică Fontana și se încălzește la flacără pînă la apariția vaporilor, timp de 20—30 secunde (frotiul trebuie să ia un aspect metalic brun); se poate repeta impregnația de 2—3 ori
- spălare cu apă distilată
- uscare
- examinare la obiectivul cu imersie.

Leptospirele apar colorate în brun-negru, iar fondul în galben.

Colorarea capsulei bacteriene. Colorația Giemsa. Preparatul se colorează timp de 20—30 minute cu soluție Giemsa (diluată în proporție de 0,5 ml soluție Giemsa la 10 ml apă distilată neutră la pH 7,2), se spală cu apă distilată, se usucă și se examinează.

Capsula se colorează în diferite nuanțe de roz pînă la violaceu, iar corpul bacterian în violet-închis. Adesea capsula nu se colorează dife-

rențiat de corpul bacterian, așa încît prezența ei se deduce după mărimea diametrului transversal al germenului capsulat în comparație cu cei necapsulați.

Colorarea simplă cu albastru de toluidină. Frotiul, fixat la flacără sau prin flambare cu alcool, se acoperă cu o soluție de albastru de toluidină, care se lasă pe lamă timp de 1—2 minute. Se varsă, se spală, se usucă și se examinează la imersie.

Capsula apare colorată în roz, iar corpul bacterian în albastru. Dă rezultate mai bune în cazul frotiurilor efectuate din organe, la scurt timp după moarte.

Metoda de colorare negativă a capsulei cu tuș de China. Pe o lamă de microscop se pune o picătură de ser fiziologic în care se suspensionează germenii de examinat, iar alături se pune o picătură de tuș de China și se omogenizează în suspensia bacteriană. Din amestec se fac apoi frotiuri cu ajutorul unei lame șlefuite sau cu ansa bacteriologică.

După uscare, se fixează frotiurile, se colorează timp de 1—2 minute cu o soluție de albastru de metilen Löffler. Se varsă colorantul, se spală cu apă și se usucă.

La examinare, pe fondul negru colorat cu tuș, apar germenii colorați în albastru. Între fond și corpul bacterian se observă o zonă clară, necolorată, care corespunde capsulei.

Metoda se folosește mai ales pentru punerea în evidență a capsulei germenilor din specia *Clostridium perfringens* și a germenilor capsulați din culturi.

Colorarea sporilor. Metoda Möller — fixare cu alcool absolut 2 minute

- tratare cu vapori de acid osmic 5 minute
- spălare cu apă de robinet
- colorarea cu fucsină Ziehl, prin încălzire de 3 ori pînă la emisia de vapori
- decolorarea rapidă cu soluție de acid azotic 1/4
- spălare cu apă de robinet
- recolorare cu albastru de metilen 1‰ timp de 2 minute
- spălare cu apă
- uscare.

Sporii apar colorați în roșu, iar bacilii în albastru.

Metoda Pooman — colorare cu fucsină Ziehl, prin încălzire de 2—3 ori pînă la apariția vaporilor

- decolorare cu acid sulfuric 1‰
- spălare cu apă
- recolorare cu albastru de metilen alcalin, timp de 2 minute
- spălare cu apă, uscare.

La examinare, sporii apar colorați în roșu, iar formele vegetative în albastru.

Metoda cu verde de malahit — frotiurile fixate prin căldură se acoperă cu o soluție de verde de malahit 5‰

— se încălzește pînă la apariția vaporilor, se lasă să se răcească, se îndepărtează colorantul; se repetă operația de 3 ori punînd de fiecare dată colorant proaspăt

- se lasă să se răcească lama
- se spală cu apă de robinet

- se recolorează cu fucsina diluată 1/10 timp de 30 secunde
- se spală, se usucă și se examinează la imersie.

Formele vegetative vor apărea colorate în roz-roșu iar sporii în verde.

Colorarea cililor. Metoda Casares—Gill. Folosește fucsina Ziehl și o soluție mordantă. Soluția mordantă se prepară prin mojararea a 10 g tanin și 18 g clorură de aluminiu lichidă în 33 ml alcool de 70°. Într-un alt mojar se dizolvă 10 g clorură de zinc și 1,5 g fucsina bazică în 10 ml apă distilată. Cele două soluții se amestecă vărsind picătură cu picătură cea de a doua soluție în prima. Păstrarea soluției se poate face la întuneric și rece, vreme îndelungată.

În vederea colorării, pe o lamă bine degresată se pune o picătură de ser fiziologic în care urmează să se facă suspensia de germeni, cu foarte lente mișcări, dată fiind fragilitatea deosebită a cililor, care se desprind cu ușurință. După uscare la aer se obține frotiul propriu-zis. Pentru obținerea unor imagini mai clare se poate recurge la suspensiunea prealabilă a germenilor în apă distilată și ținerea la 37°C timp de 2 ore, din suspensia respectivă efectuându-se frotiul.

Frotiul se acoperă cu soluția mordantă, diluată 1/5 (1 parte mordant la 4 părți apă distilată) și filtrată extemporaneu. Soluția se ține pe lamă pînă la apariția unui luciu metalic, după care se varsă. Se pune apoi fucsina Ziehl, care se lasă să acționeze 1—2 minute, se varsă, se spală, se usucă și se examinează.

Corpii bacterieni apar colorați în roșu, iar cili în roz-pal.

Determinarea dimensiunilor bacteriilor

Poate fi făcută cu oarecare aproximație prin comparație cu diferite elemente avînd dimensiuni cunoscute sau folosindu-se metode micrometrice.

Metoda comparației folosește în special elementele eritrocitare, al căror diametru este în general de 7,7—8 microni. În acest scop se amestecă o suspensie bacteriană în ser fiziologic cu o picătură de sînge. Din amestec se face un frotiu care se colorează și se examinează. Metoda are doar o valoare orientativă.

Metoda micrometrică permite aprecieri mai exacte și folosește dispozitive speciale din sticlă, pe care sînt gravate scări gradate și care se adaptează la microscop (micrometrul ocular montat sub lentila superioară a ocularului și micrometrul obiectiv, așezat pe platina microscopului). Micrometrul obiectiv se reglează astfel încît liniile zero ale celor două micrometre să se suprapună. Apoi se notează care din diviziunile celelalte se suprapun. Valoarea găsită la micrometrul obiectiv se înmulțește cu 10 (valoarea în microni a unei diviziuni) și se împarte la valoarea de pe scara micrometrului ocular, obținîndu-se valoarea în microni a unei diviziuni de pe micrometrul ocular, cu care se fac apoi determinările. Micrometrul obiectiv se scoate de pe platina microscopului și se pune preparatul de examinat. Numărul de diviziuni ocupat de formațiunea bacteriană sau celulară ce urmează să fie determinată, se înmulțește cu cifra corespunzătoare valorii în microni a unei diviziuni a micrometrului ocular, determinîndu-se astfel mărimea formațiunii respective.

Examenul bacteriologic

Examenul bacteriologic presupune izolarea, cultivarea și identificarea germenilor bacterieni din diferite produse patologice suspecte. Față de examenul microscopic, care permite decelarea prezenței agentului etiologic, metodele bacteriologice complexe permit, pe lângă izolare, și cercetarea diferitelor însușiri biologice care-l caracterizează și pe baza cărora se poate afirma cu certitudine natura procesului patologic și se pot orienta corect măsurile terapeutice de combatere în focar și de profilaxie. Faptul are o deosebită importanță și din punct de vedere epidemiologic, prin aceste examene evitându-se, de exemplu, darea în consum a unor produse animaliere care pot provoca la om infecții sau toxinfecții, uneori cu evoluție gravă. Este suficient să se amintească pericolul pe care-l prezintă, mai ales carnea animalelor sacrificate de necesitate, la care întreruperea procesului patologic, prin sacrificare, face ca modificările organoleptice și organice să nu trezească suspiciune la examinare. Un examen bacteriologic însă poate pune în evidență agenții unei salmoneloze, ai tularemiei, leptospirozei, antraxului etc. toate transmisele la om. Examenul bacteriologic dă adesea și indicii referitoare la sursa de infecție și permite deci, eliminarea ei. Așa de exemplu, identificarea la animalele tuberculino-pozitive sacrificate, a tipului aviar de bacil al tuberculozei, arată că există o sursă de infecție cu acest tip, care, dacă se elimină, se obține cu ușurință asanarea efectivului. De asemenea dacă se izolează tipul uman, simpla îndepărtare din sectorul zootehnic a persoanei eliminatoare de bacili se soldează cu autoasanarea efectivului, transmiterea interbovină a acestui tip de infecție nerealizându-se de regulă.

Depistarea infecției cu *Salmonella typhimurium* la bovine dă indicii cu privire la posibilitatea contractării infecției de la rozătoarele din adăposturile respective.

Produsele patologice folosite pentru punerea în evidență a germenilor bacterieni sînt în principiu aceleași ca și la examenul microscopic.

Sîngele. Cînd se folosește pentru cultivarea unor germeni eventual prezenți în el, se realizează așa-numita hemocultură. În acest scop, se va recolta sînge de la animalele suspecte, în mod steril, în eprubete cu anticoagulant sau cu perle de sticlă și se însămînțează pe medii corespunzătoare. Trebuie avută în vedere o proporție optimă a sîngelui față de mediul respectiv, pentru a asigura, pe de o parte, neutralizarea efectului bactericid al sîngelui, și pe de alta, condițiile nutritive proprii unei dez-

voltări optime. Această proporție este de 1/20, 1/30. Pentru a bloca acțiunea fagocitară a leucocitelor conținute de sângele însămînțat se poate recurge și la un adaos de saponină în proporție de 2‰ (2 ml saponină 1‰ la 100 ml lichid). Dacă individul de la care provine sângele de examinat a fost supus unui tratament cu penicilină sau sulfamide, este necesar să se adauge 5 mg acid paraaminobenzoic la 100 ml mediu care să neutralizeze efectul inhibitor al acestora.

Se poate practica și hemocultura din coagul de sânge, mai ales în cazul unor microbi mai greu de izolat sau cînd metodele precedente nu au dat rezultate (de exemplu brucele). În acest scop, o cantitate de 10 ml sânge, recoltat în condiții de asepsie perfectă, se lasă să se coaguleze, apoi se înlătură serul exprimat și, în condiții de sterilitate riguroasă (la flacără sau în boxă sterilă), se toarnă coagulul într-un flacon cu 100 ml mediu lichid. Incubația, la 37°C și eventual în atmosferă îmbogățită în CO₂, se urmărește circa o lună, practicîndu-se periodic subculturi.

Lichidul cefalorahidian se însămînțează pe medii diferite, în funcție de suspiciune, în cantitate de cel puțin 0,5 ml. În mod obișnuit se fac însămînțări pe bulion glucozat și pe plăci cu sânge gelozat. Dacă se suspicionează meningite tuberculoase, se vor face însămînțări pe medii selective (Löwenstein-Jensen este cel mai folosit), după prealabilă tratare alcalină, pentru distrugerea eventualei flore secundare. În cazul leptospirozei se are în vedere că leptospirele pot fi decelate la acest nivel numai în faza de leptospiremie, deci în prima săptămînă de boală.

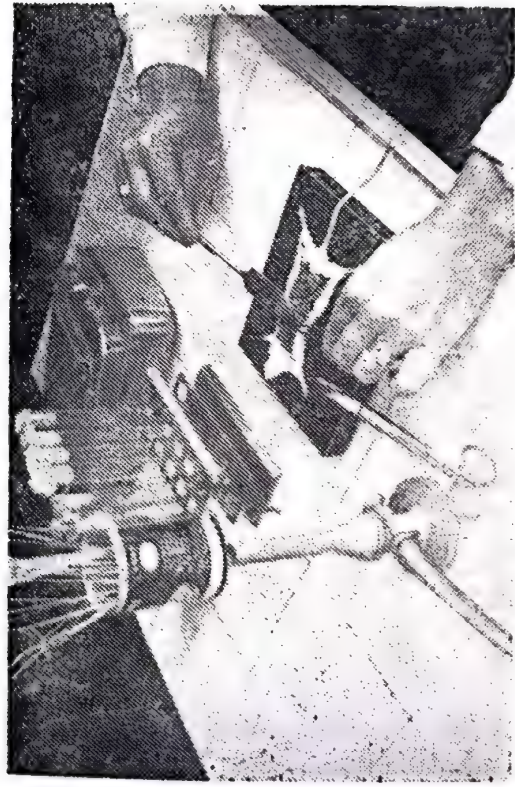
Urina este preferabil să se recolteze prin cateterism pentru a evita contaminarea de pe căile urinare. Faptul este desigur posibil la femele și foarte dificil la masculi. Înainte de recoltare este bine să se suspende administrarea de antibiotice sau chimioterapice, urmele acestora avînd o acțiune inhibitoare în dezvoltarea germenilor. Însămînțările se vor face cît mai repede după recoltare, pentru a împiedica multiplicarea eventualilor germeni de contaminare.

Pentru aceasta se vor însămînța, direct, 3—4 picături de urină luate cu pipeta Pasteur, pe suprafața unei plăci cu geloză simplă și una cu geloză cu sânge, după care se dispersează cu ansa pe toată suprafața mediului.

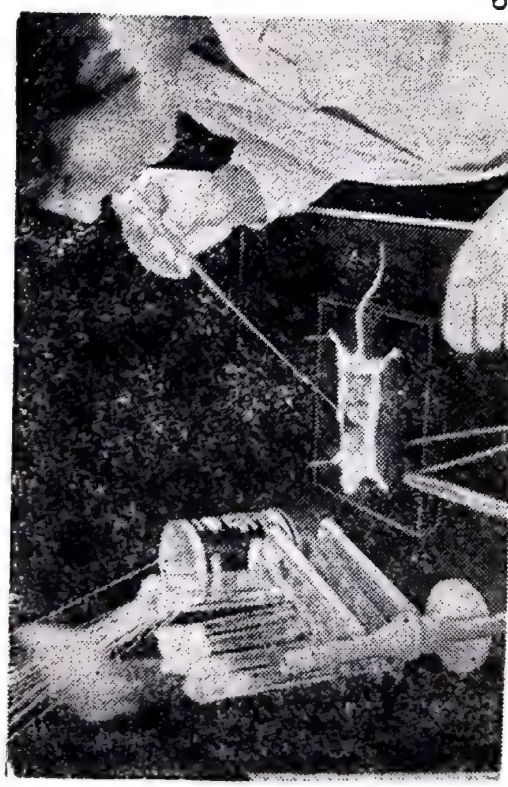
Se iau apoi 10 ml urină și se centrifughează 10 minute la 3000 t/minut, iar din sediment se procedează la o nouă însămînțare pe o placă cu geloză-sânge și pe bulion glucozat. Cînd se suspectează un anumit tip de infecție se poate recurge încă din această etapă la medii speciale (Drigalski pentru *E. coli* și salmonelle, Löwenstein—Jensen pentru bacili ai tuberculozei, mediul Korthoff pentru leptospire). În cazul leptospirozei se are în vedere că leptospirele se elimină prin urină numai după 8 zile de la debutul bolii. Uroculturile ce se practică în acest scop, este bine să fie precedate de o dietă alcalină, care să evite lizarea leptospirelor în mediul acid al urinei. Însămînțarea se face din sedimentul de centrifugare pentru a explora o cantitate cît mai mare de urină. Incubarea tuburilor însămînțate se face la 28—30°C, controlîndu-se apariția leptospirelor în cultură la microscop, din 5 în 5 zile, timp de două luni.

În momentul în care se observă apariția leptospirelor în mediu, se fac pasaje pe alte medii, noi.

Organele, prin conținutul lor bogat în germeni, se pretează pentru izolarea acestora în condiții foarte bune. Avînd în vedere însă rapidita-

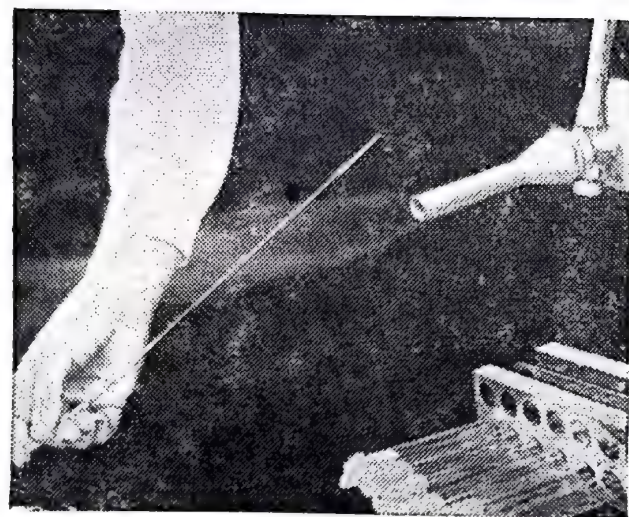


A



C

Fig. 15 — Efectuarea însămînțării din organe
A — cauterizarea suprafeței organului; B — flambarea pipetel Pasteur;
C — recoltarea materialului patologic cu eșuorul pipetel Pasteur



B

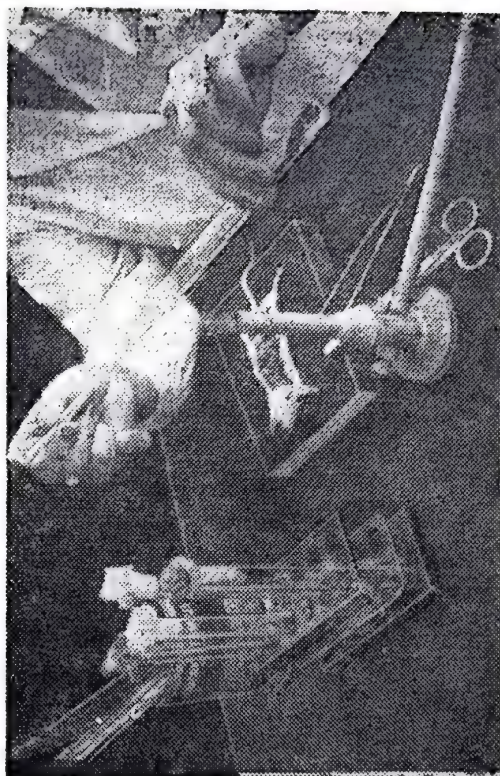


Fig. 16 — Însămînțarea pe medii de cultură

tea cu care se multiplică germenii de putrefacție și saprofitii, care în perioada de agonie difuzează pe cale circulatorie, este necesar să se efectueze însămînțările cît mai repede după moarte și să se aleagă în acest scop organele care se pretează în cel mai înalt grad pentru izolarea germenilor. Unul dintre țesuturile care conferă o garanție că germeul izolat este incriminat în procesul patologic dat, este măduva osoasă. În acest țesut, complet izolat prin peretele osos, de mediul înconjurător, germenii ajunși pe cale circulatorie pot fi izolați de cele mai multe ori în stare pură; prezența lor denotă o septicemie și, cu mare probabilitate, determină și agentul etiologic. Urmează apoi cordul, care de asemenea este locul de unde, în caz de septicemie sau chiar numai de bacteriemie, se pot izola germenii în stare pură. Există situații în care agentul causal poate fi izolat numai de la nivelul unor anumite țesuturi, unde se localizează cu predilecție. Astfel, listeriile, la specia ovină, pot fi izolate mai ales de la nivelul sistemului nervos central; bacilii rujetului în formele cronice de endocardite, de la nivelul vegetațiilor endocardice; salmonellele abortigene mai ales din avortoni (conținutul stomacal, intestinal, bilă, al acestora); *Cl. chauvoei* de la nivelul tumorii emfizematoase musculare, *Cl. perfringens* din conținutul intestinal și din ganglionii mezenterici etc.

Ca tehnici de însămînțare pot fi aplicate mai multe procedee:

a) *Cu pipeta Pasteur*. Se cauterizează suprafața organului cu o spatulă încălzită, se extrage cu ajutorul unei pipete Pasteur, flambată și ea și răcită, o cantitate de lichid organic din profunzime și se însămînțează întâi pe mediul lichid (bulion), iar apoi pe mediul solid (agar înclinat, agar cu sînge, agar cu ser etc.). În cazul oaselor lungi, se flambează temeinic suprafața de secționare și, cu pipeta Pasteur, se extrage prin mișcări repetate de du-te-vino spre profunzime, lichid din măduva osoasă, care se introduce apoi în mediile de cultură. Se înțelege că la închiderea și deschiderea tuburilor se iau toate măsurile de asigurare a sterilității, flambind gura lor imediat după deschidere și înainte de închidere.

b) *Cu ajutorul acului de însămînțare drept*. Se cauterizează suprafața organului și se sterilizează acul prin încălzire la roșu (țija se trece și ea de 3 ori prin flacără), iar după răcire se înțeapă organul prin suprafața cauterizată, făcînd cîteva mișcări spre interior. Se scoate acul din organ și se face însămînțarea prin clătirea acestuia în mediul lichid. Fără a se flamba, acul se introduce apoi în tubul cu mediul solid, făcîndu-se pe suprafața acestuia mișcări în zig-zag, începînd de la baza mediului spre partea superioară, sau se clătește acul în lichidul de condensare, după care se umectează întreaga suprafață a mediului cu acest lichid, prin înclinări repetate. După fiecare probă, acul se sterilizează prin înroșire la flacără.

c) *Cu porțiuni de organ*. Cînd organul a fost recoltat în condiții de sterilitate (mai ales în cazul animalelor mici) se poate recurge la secționarea unor bucăți cu ajutorul unor instrumente sterile, iar cu una din suprafețele secțiunii se dispersează materialul patologic pe suprafața unei plăci cu mediu. În unele laboratoare această tehnică este folosită aproape în exclusivitate.

d) *Prin introducerea directă în mediu a porțiunilor de organ*. Metoda se folosește mai rar, în special cînd se bănuiește sărăcia în germeni a

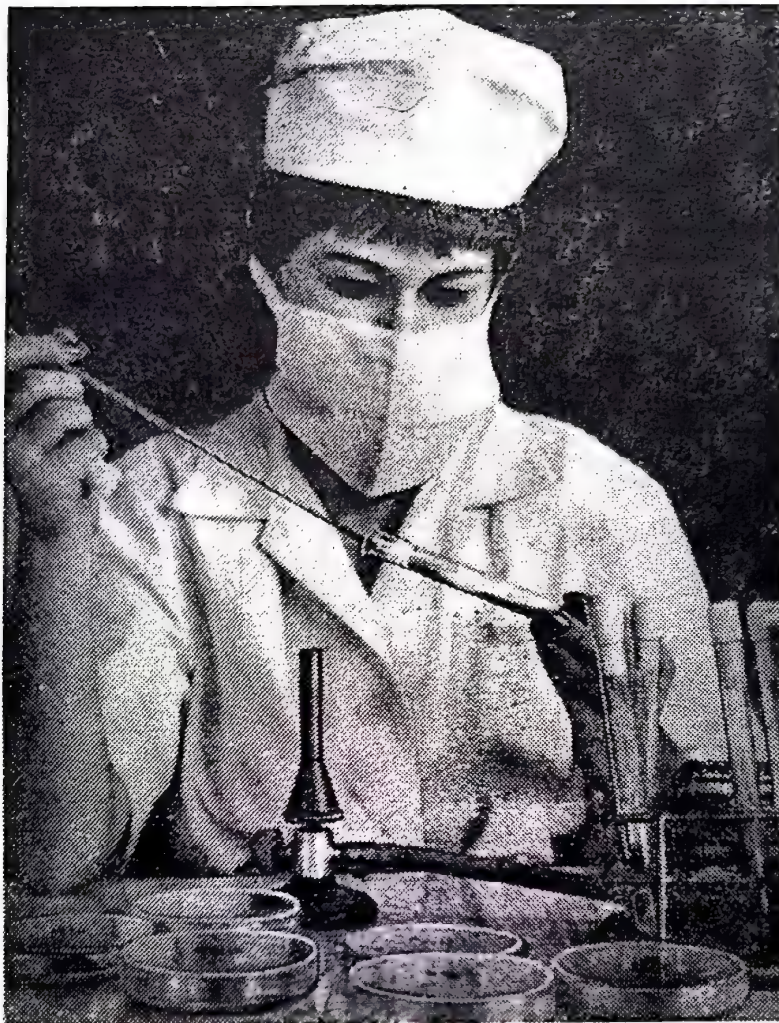


Fig. 17 — Tehnica însămînțării

materialului patologic. Recoltarea și manipularea acestuia trebuie să se facă în condiții de sterilitate perfectă.

Ca principiu general, se va evita deschiderea organelor sau secționarea țesuturilor înainte de recoltarea materialului pentru examenul bacteriologic.

— *Secrețiile* (nazală, oculară, mai rar salivară) se însămînțează direct cu tamponul steril, cu care au fost recoltate, atât pe mediile lichide, cât și pe cele solide. Se poate recurge și la spălarea tampoanelor respective în ser fiziologic steril, din care apoi se fac însămînțările pe aceleași medii.

— *Transsudatele și exsudatele* se supun de preferință unei centrifugări obișnuite (3000 T/minut timp de 10 minute în tuburi de centrifugă sterile), iar din sediment se vor practica însămînțările de rigoare.

Tehnica transplantărilor. Are ca scop fie izolarea din culturile mixte a diferiților germeni în stare pură, fie menținerea lor în timp, în condiții de laborator (tulpini de colecție).

Din culturile pe medii lichide, transplantarea se face cu pipeta Pasteur sau cu ansa de însămînțare. În primul caz, se recoltează o cantitate

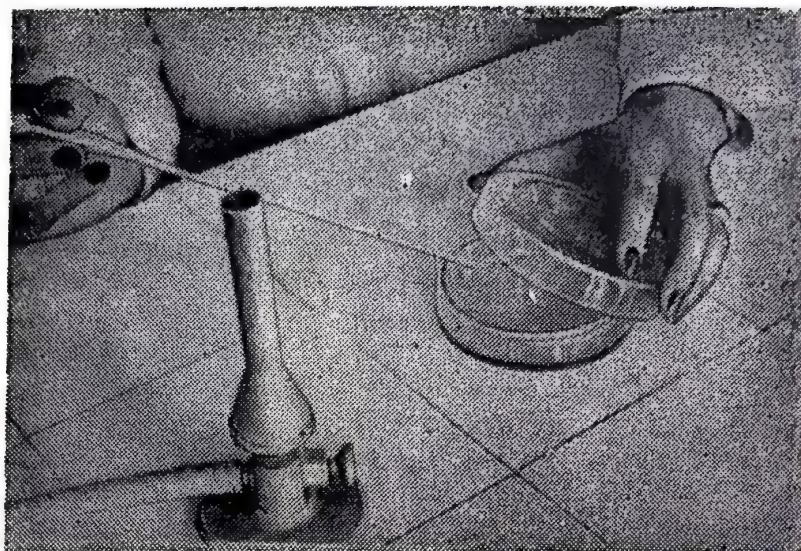


Fig. 18 — Însămînțarea în placa Petri cu agar

arbitrară (cîteva picături) din cultura veche, care apoi se însămînțează în mediul proaspăt. În cel de al doilea, se introduce ansa flambată și răcită în cultura veche, după care se face însămînțarea pe mediile proaspete (întîi în mediul lichid și apoi în mediul solid, dacă e cazul).

Din culturile pe medii solide, transplantarea se face cu ansa, racind o cantitate foarte redusă de cultură, care apoi se depune pe mediile proaspete.

În timpul însămînțărilor, de orice natură, este necesar să se aibă în vedere cîteva reguli general valabile:

- însămînțările se execută în boxe sterile sau în hote speciale, care permit sterilizarea periodică și nu permit formarea de curenți de aer în timpul lucrului;

- în timpul operațiunilor de însămînțare se evită pe cît posibil conversația și orice mișcare de prisos în jurul operatorului;

- instrumentul cu care se execută însămînțarea nu trebuie să fie atins de nici un fel de obiect nesteril (mîna, halat, masă de lucru etc.);

- însămînțările se vor executa cît mai repede, cu scopul de a reduce la minim contactul materialului de însămînțat cu atmosfera ambiantă;

- în timpul cît recipientele sau tuburile de cultură, sterile sau însămînțate, sînt deschise, vor fi ținute în

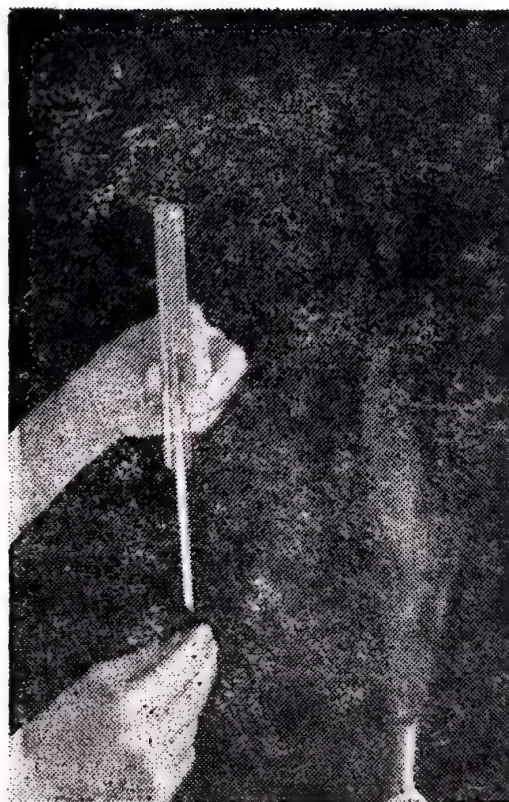


Fig. 19 — Însămînțarea în agar prin înțepare

poziție înclinată, cât mai aproape de flacără, pentru a evita contaminarea cu germeni sau spori din atmosferă;

— imediat după însămînțare se face notarea tuburilor cu creioane dermatografe, creioane speciale sau cerneală de scris pe sticlă, fără a se omite data însămînțării.

Mediile de cultură folosite pentru izolarea diferitelor tipuri de bacterii

Pentru a pune un diagnostic bacteriologic corect, sigur și prompt, folosirea unor medii de cultivare corespunzătoare este de o importanță hotărîtoare. Cunoscîndu-se însușirile germenilor căutați, condițiile lor optime de dezvoltare, bacteriologul trebuie să folosească mediile cele mai eficiente și indicate de izolare, în funcție de specia microorganismului în cauză.

Un mediu de cultură trebuie să asigure substratul nutritiv pentru creșterea și multiplicarea microbilor, să aibă un pH care să permită desfășurarea normală a proceselor metabolice microbiene (în general 7,2—7,4), să asigure condițiile de aerobioză sau anaerobioză, să fie păstrate în recipiente care să împiedice contaminarea cu alți microbi și să fie ușor de manevrat. În general, microbii patogeni se dezvoltă optim la temperatura corpului speciei de la care sînt izolați. Sînt însă și specii microbiene care preferă temperaturi mai joase (leptospirele se multiplică la 28—30°C).

Mediile de cultură se pot împărți în două categorii: — medii uzuale (obișnuite), pe care se dezvoltă majoritatea germenilor patogeni. Ele pot fi: pentru bacterii aerobe; pentru bacterii anaerobe; — medii speciale, destinate izolării, cultivării și cercetării însușirilor biologice ale anumitor specii de germeni. Ele pot fi: de izolare, de îmbogățire, selective, diferențiale.

Mediile speciale de izolare favorizează dezvoltarea anumitor germeni, care nu se pot cultiva de la început pe mediile obișnuite, ei necesitînd anumite condiții speciale sau anumiți „factori de plecare”. Astfel sînt mediile cu ser, cu sînge (pentru *Pasteurelle*, *Corynebacterium*), cu glicerină, cu cartof, cu ou (pentru micobacterii).

Mediile de îmbogățire sînt folosite pentru cazurile în care în produsul patologic de examinat se bănuiește o cantitate mică de germeni patogeni și un număr mare de germeni din flora de asociație. Astfel de medii sînt mediul Kaufmann—Müller (pentru enterobacteriaceae), mediul Chapman (pentru stafilococi patogeni), mediul Korthoff (pentru leptospire).

Mediile selective favorizează, prin compoziția lor chimică, dezvoltarea anumitor germeni. Astfel sînt mediul Wilson—Blair și Drigalski (pentru salmonele), mediul Istrati—Meitert (pentru *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*), mediile Löwenstein—Jensen, Sauton, Youmans (pentru micobacterii) mediile Czapek, Sabouraud (pentru ciuperci).

Mediile diferențiale permit creșterea diferențiată a unor specii microbiene sau pun în evidență anumite particularități metabolice cu semnificație diagnostică. Ele evidențiază anumite procese biochimice caracte-

ristice metabolismului anumitor specii de bacterii, permițind în acest fel identificarea lor (fenomene proteolitice, zaharolitice, oxidoreductoare etc.). Includerea în componența acestor medii a unor substanțe indicatoare sau revelatoare este menită să facă vizibil procesul respectiv. Astfel pot fi citate mediul Fergusson (pentru evidențierea ureazei) mediul cu acetat de plumb (pentru detectarea formării de hidrogen sulfurat), mediul Drigalski (pentru diferențierea speciilor lactozo-pozitive) etc.

Pentru speciile de germeni anaerobi se folosesc de asemenea medii speciale, cum ar fi bulionul de ficat, geloza Veillon, geloza cu sînge Zeissler, iar pentru determinarea mobilității unor germeni mediul semisolid Tittsler—Sandholzer.

După starea lor fizică mediile se pot împărți în: solide, semisolide, lichide.

După compoziție pot fi: medii simple și complexe.

Există și medii „sintetice” bazate pe componente cunoscute din punctul de vedere al structurii lor chimice. În comparație cu bulionul, agarul sau alte medii ale căror componente nu sînt identificate chimic în totalitate, mediile sintetice au avantajul că permit anumite determinări capabile să ofere relații asupra metabolismului bacterian (prin dozarea înainte și după cultivare a diferitelor componente se poate cunoaște ce anume a fost consumat în cursul multiplicării și în ce cantitate).

Dintre cele mai frecvent folosite medii de cultură sînt date, în cele ce urmează, cîteva rețete și moduri de preparare.

Apa peptonată este unul din cele mai simple medii de cultură, dar care are largi utilizări, în special cînd i se adaugă zaharuri, în vederea determinării spectrului zaharolitic al diferitelor specii de bacterii. Se prepară din:

— apă distilată	100,0 ml
— peptonă	1,0 g
— NaCl	0,5 g

Se ajustează pH-ul la 7,2—7,4, se încălzește 15 minute la 115°C pentru precipitare, se filtrează prin hîrtie de filtru și se sterilizează din nou la autoclav.

Cînd se adaugă zaharurile, acestea se pun în proporție de 1% în balonașe separate, se adaugă albastru de bromtimol (12 ml la 1 l de mediu) ca indicator și se sterilizează prin tindalizare 30 de minute, 3 zile consecutiv. Soluția de albastru de bromtimol folosită în acest scop se prepară din: 1 g albastru de bromtimol + 25 ml NaOH n/10 + 475 ml apă distilată.

Bulionul de carne se prepară mai ales din carne de bovine și cabaline, mai rar din cea de pasăre. Mușchii se curăță de aponevroze, tendoane, fascii și grăsimi, se taie bucăți mici, sau se toacă la mașina de tocat carne. La 500 g tocătură, se adaugă 1000 ml apă de robinet, se ține 24 de ore la rece, pentru macerare, apoi se fierbe 30 minute, se decantează și se stoarce, iar lichidul obținut se filtrează prin mai multe straturi de tifon și se completează cu apă la volumul inițial. Se încălzește la 80—90°C și se adaugă peptonă 10 g și NaCl 5 g la 1000 ml lichid.

Se ajustează pH-ul cu o soluție de NaOH n/1 (la 7,2—7,6) prin metoda colorimetrică. Se încălzește la autoclav la 115°C timp de 15 minute. Încălzirea în prezența NaOH produce o precipitare abundentă, ceea ce impune o filtrare prin hîrtie de filtru. Apoi se face repartizarea în tuburi, în

cantitate de cca 5 ml, în sticle sau baloane, care se astupă cu dopuri de vată și se sterilizează 30 minute la autoclav la 115°C.

Pentru repartizare se pot folosi pipete de 25—50 ml, dar cel mai practic este să se folosească dispozitive speciale constând din vase cu tubulură inferioară sau pîlnii suspendate, prevăzute cu un tub de cauciuc și clemă. În unele laboratoare există dispozitive automatizate care asigură un debit constant, reglabil.

Bulionul astfel preparat are un aspect asemănător cu untdelemnul și trebuie să fie perfect limpede.

Păstrarea lui se poate face vreme îndelungată în vase bine închise, în încăperi reci și la adăpost de lumină.

În funcție de speciile bacteriene care urmează a fi cultivate, pot fi preparate și alte variante de bulion, cum ar fi bulionul triptic sau bulionul Martin. Ele diferă de bulionul obișnuit prin aceea că peptona este înlocuită cu alte preparate, asemănătoare ca structură chimică. Astfel, în cazul bulionului triptic se folosește un extract de carne obținut prin digestia acesteia sub acțiunea tripsinei iar în cazul bulionului Martin, se folosește un extract de stomac de porc, obținut prin acțiunea acidului clorhidric.

La ora actuală, este din ce în ce mai răspîndită folosirea extractelor de carne care sînt livrate în stare deshidratată, purificată și standardizată, ceea ce asigură obținerea unor medii de o calitate superioară (extractele Difco, Merck, Oxoid etc.).

Agarul nutritiv (geloza) este un mediu solid obținut prin adăugarea la bulionul de carne a agarului (fibre sau pulvis). Acesta nu are nici un rol nutritiv, dar determină solidificarea mediului.

La 1 litru de bulion, se calculează 30 g agar fibre sau 25 g agar pulvis, care se topește apoi prin încălzire la 115°C, timp de 15 minute la autoclav. Se filtrează prin vată, în autoclavul cu capacul deschis (pentru a evita solidificarea pe parcursul filtrării).

Se repartizează în eprubete sau alte recipiente unde urmează a fi păstrat. Se astupă cu dopuri de vată, se sterilizează 20 de minute la 120°C după care eprubetele se pun în poziție înclinată pentru solidificare.

Păstrarea se poate face în flacoane închise etanș pentru a evita pierderea apei, dar în general este bine să nu se prepare șarje prea mari pentru a dispune de mediu cît mai proaspăt.

Agarul moale este un mediu semisolid, folosit pentru cultivarea și mai ales pentru conservarea tulpinilor bacteriene.

Se prepară la fel ca agarul înclinat, cantitatea de agar fiind însă mai redusă (2—5 g agar la 1000 ml bulion).

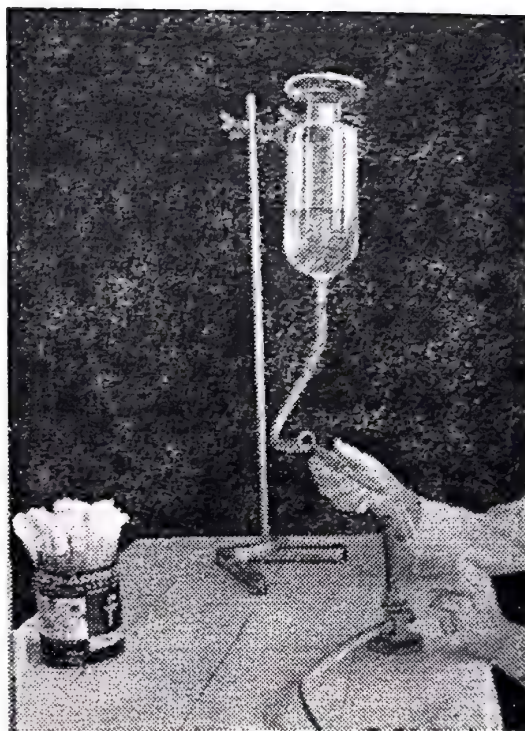


Fig. 20 — Distribuirea mediilor de cultură

Bulionul cu ficat se folosește pentru cultivarea bacteriilor anaerobe și se bazează pe faptul că țesuturile animale cum sînt ficatul, rinichiul, mușchiul, prin conținutul lor în cistină, au capacitatea de a fixa oxigenul din mediu, creînd astfel condiții favorabile dezvoltării bacteriilor anaerobe.

Pentru preparare, ficatul proaspăt (preferabil de bovine) se fierbe și se taie în fragmente de formă paralelipipedică, cu înălțimea de 3—4 cm și lățimea de 1—2 cm. Aceste porțiuni de ficat se introduc în tuburi cu bulion simplu, se adaugă glucoză în proporție de 1% (la fiecare tub se pun 5—6 picături dintr-o soluție de glucoză 20%) și se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

Dacă mediul se folosește după un oarecare timp de la preparare, se face regenerarea lui prin fierbere timp de 10 minute în baie de apă (pentru eliminarea oxigenului dizolvat în mediu).

Bulionul cu ficat și carne (VF) se folosește în același scop ca și precedentul. Pentru preparare, la 1000 ml apă distilată se adaugă 250 g carne de vițel și 250 g ficat de vițel, tocate mărunt. Fierberea timp de 20 minute este urmată de filtrarea prin tifon. Amestecul de ficat și carne rămas pe tifon se spală de 4—5 ori cu apă distilată și se usucă. Sub această formă se adaugă la tuburile cu bulion de carne obișnuit, în cantitate de 1—3 g/tub.

Lichidul rezultat din filtrare se completează cu apă la volumul inițial de 1000 ml, se adaugă 5 g peptonă și 5 g NaCl. Se încălzește pînă la dizolvarea acestora și se ajustează pH-ul la 8. Se autoclavează 20 minute la 120°C, după care se adaugă glucoză 2%. Se filtrează prin hîrtie de filtru și se repartizează cîte 6 ml în tuburile în care s-au pus în prealabil 3 g din amestecul de carne și ficat. La suprafață se poate adăuga un strat de oleu de parafină, de aproximativ 1 mm grosime. Mediul se sterilizează timp de 15 minute la 115°C sau prin tindalizare la 100°C timp de 30 minute, 3 zile consecutiv (cu capacul autoclavului nefixat).

Geloza Veillon servește mai ales pentru cultivarea germenilor anaerobi. Se prepară din:

— bulion de carne	1 000 ml
— agar fibre	8—10 g
— glucoză	5—10 g
— azotat de potasiu	1—2 g

Se dizolvă mai întîi glucoza și azotatul de potasiu în bulion, se adaugă agarul tăiat mărunt, se încălzește la autoclav, se filtrează prin vată și se repartizează în tuburi înguste Weinberg (8—10 mm diametru și 20—25 cm înălțime) astfel ca mediul să ocupe mai mult de jumătate din înălțimea tubului. Se sterilizează la 100°C timp de 15 minute și se solidifică în poziție verticală.

Adăugarea azotatului de potasiu se face cu scopul de a preîntîmpina fragmentarea mediului prin gazele produse în cursul metabolismului bacterian. Bioxidul de carbon și hidrogenul care rezultă în cursul dezvoltării germenilor sînt transformate în prezența azotatului de potasiu în carbonat de potasiu și apă.

Bulionul și agarul cu ser se folosesc pentru izolarea primară a unor bacterii (pasteurele, corynebacterii, unii streptococi etc.).

Se prepară din medii uzuale (bulion, agar) la care se adaugă ser normal nefenicat în proporție de 1/10 (de obicei ser de cal). Recoltarea

singelui pentru obținerea serului se face în recipiente sterile prevăzute cu baghete de sticlă așezate încrucișat. După exprimarea serului, se decantează în flacoane sterile. Se face controlul sterilității lui prin însămînțări pe medii de cultură și dacă nu este steril se filtrează imediat prin filtrul Seitz EKS.

Pentru prepararea agarului cu ser, mediul se topește în prealabil, se lasă să se răcească la 45°C, se adaugă serul, se omogenizează și se lasă să se solidifice în poziția dorită. După adăugarea serului, mediile se controlează din punct de vedere al sterilității, ținându-se la termostat 24 de ore.

Mediile glicerinate se folosesc pentru cultivarea bacililor tuberculozei, morvei, brucelelor, cele mai uzuale fiind bulionul glicerinat, agarul glicerinat și cartoful glicerinat.

Bulionul și agarul glicerinat se pregătesc prin adăugarea de glicerină 10% la mediile obișnuite. Sterilizarea se face la 110°C timp de 20 minute.

Pentru pregătirea cartofului glicerinat se taie din cartofi de bună calitate curățați, bucăți cilindrice (cu ajutorul unor preducele speciale avînd diametrul ceva mai mic decît al tubului de cultură). Cilindrii respectivi se taie oblic pe diagonală, rezultînd două bucăți identice care se spală în apă și se țin 3 ore într-un vas cu 10% carbonat de sodiu, pentru neutralizare (au o reacție ușor acidă). Fiecare felie se introduce apoi în cîte un tub Roux, prevăzut cu o gîtitură la nivelul căreia felia respectivă se oprește. Apoi se toarnă în tuburi bulionul glicerinat 5%, pînă la nivelul gîtiturii în așa fel ca partea inferioară a cartofului să fie umectată în permanență cu bulionul glicerinat. Sterilizarea se face la 110°C timp de 20 minute.

Mediul Löwenstein-Jensen este un mediu pe bază de ou, cel mai larg folosit pentru cultivarea micobacteriilor. Se prepară inițial o soluție salină compusă din:

— fosfat monopotasic	2,4 g
— sulfat de magneziu	0,24 g
— citrat de magneziu	0,6 g
— asparagină	3,6 g
— glicerină neutră	12,0 ml
— apă distilată	600,0 ml

După dizolvarea ingredientelor se sterilizează la autoclav.

Ouăle care urmează să fie folosite pentru prepararea mediului trebuie să fie proaspete, curate și relativ uniforme. Un număr de 22—26 ouă se spală întii cu apă și săpun, cu ajutorul unei perii, se clătesc abundant cu apă și apoi se șterg cu un prosop curat și se pun timp de 30 minute în alcool 70° (nu sanitar) după care se pun într-un recipient curat. La flacără, de preferință în boxa sterilă, ouăle se sparg pe rînd cu ajutorul unei pense flambate și conținutul se scurge într-un balon rotund de 1 l, cu fund plat, sterilizat prin autoclavare și care conține perle de sticlă (pentru ușurarea scurgerii conținutului după spargerea oului la un capăt, se face un orificiu și la celălalt). După spargerea tuturor ouălor, conținutul acestora se omogenizează temeinic prin agitare și apoi se filtrează prin mai multe straturi de tifon sterilizat în prealabil, într-o pîlnie de dimensiuni corespunzătoare. Pentru facilitarea filtrării este bine ca pîlnia să fie montată la un balon Kitasato, adaptat la o trompă de vid. Se adaugă apoi 20 ml soluție 20% de verde de malahit și soluția salină

(rece) omogenizându-se. Amestecul are o culoare verde-deschis. Se repartizează amestecul în eprubete sterile, la flacără, câte 5—6 ml, se înclină și se coagulează la etuvă, la 85°C, 3 zile consecutiv, câte 45 de minute. Este preferabilă coagularea în mediu umed (în dispozitive speciale care permit înclinarea tuburilor la nivelul dorit și formarea de căldură umedă de vapori la nivel constant).

Tot în cultivarea micobacteriilor se mai pot folosi mediile descrise mai departe.

Mediul solid cu plasmă umană (original) a fost folosit cu rezultate foarte bune în obținerea unor culturi abundente, chiar și în cazul lui *M. bovis*, care se cunoaște că se dezvoltă disgonic. Mediul se prepară dintr-un amestec salin compus din:

— KH_2PO_4	2,5 g
— K_2HPO_4	2,5 g
— MgSO_4	1,0 g
— Citrat de sodiu	2,5 g
— Asparagină	5,0 g
— Glicerină neutră	40,0 ml
— CuSO_4 sol. 0,001%	1,0 ml
— MnSO_4 sol. 0,001%	1,0 ml
— Apă distilată	960,0 ml

Dizolvarea realizată prin fierbere la baia de apă este urmată de adăugarea a 25 g agar pulvis (Difco, BDH). După topire, se face o filtrare prin vată și sterilizarea la autoclav (121°C timp de 15 minute). Lichidului răcit apoi la temperatura de 55°C i se adaugă 100 ml plasmă umană, încălzită și ea la 45—50°C și 100 000 U.I. penicilină. Omogenizarea temeinică este urmată de repartizarea în tuburi sterile, în cantitate de 5—6 ml și înclinarea pentru solidificare. Se obține un mediu solid, transparent, de culoare gălbuie, foarte asemănător cu agarul obișnuit.

Mediul Sauton este un mediu glicerinat, sintetic, lichid, compus din:

— asparagină	4,0 g
— acid citric	2,0 g
— fosfat bipotasic	0,5 g
— sulfat de magneziu	0,5 g
— citrat de fier amoniacal	0,005 g
— glicerină	60,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Asparagina și sărurile se dizolvă într-o parte din apa încălzită la 70°C, după care se adaugă glicerina și restul de apă. Se ajustează pH-ul la 7,2, se repartizează în recipiente și se sterilizează.

Mediul Youmans se folosește pentru cultivarea micobacteriilor și are următoarea compoziție:

— asparagină	5,0 g
— fosfat monopotasic	5,0 g
— sulfat de potasiu	0,5 g
— citrat de magneziu	1,5 g
— glicerină	20,0 g
— apă distilată ad	1 000,0 ml

Asparagina și sărurile se dizolvă într-o parte din apa încălzită la 70°C, după care se adaugă glicerina și se ajustează pH-ul la 7,0—7,2.

Agarul 7H-10 Middlebrook se folosește pentru cultivarea micobacteriilor și în special pentru obținerea maselor bacteriene destinate reacțiilor serologice de identificare a acestora.

— Mediul de bază:

— K_2PO_4	1,5 g
— Na_2HPO_4 (anh.)	1,5 g
— citrat trisodic. $2H_2O$	0,4 g (10% : 4 ml)
— $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g (5% : 1,0 ml)
— $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,005 g (0,5% : 1,0 ml)
— $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 g (0,05% : 2,0 ml)
— $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001 g (0,05% : 2,0 ml)
— apă distilată ad	1000,0 ml

Se autoclavează la 120° timp de 10 minute.

La 1 l mediu de bază se adaugă:

— L-glutamat de sodiu 20%	2,5 ml (0,5 g)
— sulfat de amoniu 20%	2,5 ml (0,5 g)
— glicerină	5,0 ml (6,25 g)
— citrat ferroamoniacal 1%	4,0 ml (0,04 g)
— piridoxină HCl 100 mcg/ml	10,0 ml (0,001 g)
— biotină 100 mcg/ml	5,0 ml (0,0005 g)
— verde de malahit 1 mcg/ml	1,0 ml (0,001 g)

Se ajustează pH-ul la 6,8. Se repartizează câte 200 ml în 5 flacoane Erlenmayer de 500 ml și fiecareia i se adaugă 1,5% (3,0 g) agar pulvis. Se autoclavează la 120°C timp de 10 minute (nu mai mult) se răcește la 50—60°C și se adaugă fiecărui flacon cu 200 ml mediu:

— glucoză soluție 50%	0,8 ml (0,2%)
— catalază tehnică 1%	0,4 ml (0,2 mg%)
— complex acid oleic-albumină	20,0 ml

Dacă se dispune, se poate înlocui cu DIFCO Enrichment OADC în aceeași cantitate. Se amestecă prin rotație moderată, pentru a se evita formarea bulelor de gaz și se repartizează în eprubete sau plăci Petri.

Mediul Korthoff este folosit pentru cultivarea leptospirelor. El conține:

— peptonă Witte	0,4 g
— Cl_2Ca	0,700 g
— Na_2HCO_3	0,010 g
— KCl	0,020 g
— KH_2PO_4	0,090 g
— Na_2HPO_4	0,480 g
— apă distilată	500,0 ml

După dizolvarea ingredientelor, soluția se sterilizează la 100°C timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în baloane și se sterilizează din nou la 115°C timp de 30 minute, după care se adaugă ser de iepure steril în proporție de 5—10%. Acesta trebuie să fie în prealabil inactivat timp de 30 minute la 56°C. În final pH-ul trebuie să fie de 7,2—7,4. Se controlează sterilitatea prin incubație timp de 48 de ore la 37°C. Se vor folosi numai mediile perfect limpezi.

Mediul *Uhlenhuth* se folosește pentru cultivarea leptospirelor. În acest scop se fierbe apă de fîntină pînă ce volumul ei se reduce la jumă-

tate, se ajustează pH-ul la 7,2—7,4. Se repartizează apoi în eprubete mici (10/120 mm) sau alte recipiente, se sterilizează 20 minute la 120°C și se adaugă ser de iepure în proporție de 5—10% inactivat în prealabil la 56°C timp de 30 minute.

Mediul Terskih se folosește tot pentru cultivarea leptospirelor. Constă din:

- apă distilată 90 ml
- soluție tampon Sørensen pH = 7,2 10 ml

Se sterilizează la autoclav timp de 30 minute la 120°C, după care se adaugă 7—10 ml ser de iepure inactivat și se distribuie în tuburi sterile.

Soluția tampon Sørensen este formată din: soluția A (11,876 g fosfat disodic anhidru în 1000 ml apă) și soluția B (9,078 g fosfat monopotasic anhidru în 1000 ml apă). Amestecarea acestora se face în proporție de 8 ml soluție A și 2 ml soluție B.

Mediile hiperclorurate au o acțiune selectivă, permițând dezvoltarea stafilococilor și unor streptococi (enterococi), inhibând în același timp dezvoltarea celorlalte specii bacteriene. Concentrația NaCl în aceste medii este de 6,5%.

Agarul cu sulfatiazol. Adăugarea de sulfatiazol la agarul obișnuit în proporție de 0,002% are capacitatea de a inhiba mobilitatea speciei *Proteus vulgaris*, permițând în acest fel izolarea germenilor patogeni din culturi sau materiale patologice contaminate cu *Proteus*.

Mediile cu antibiotice. Se folosesc în scopul izolării unor germeni din grupa micoplasmelor, a ciupercilor din materialele contaminate cu alte bacterii și a mutantelor antibiorezistente ale bacteriilor. Adăugarea antibioticelor se face în proporții variabile în funcție de natura acestora.

Mediile cu substanțe colorante. *Cristalul violet* adăugat în proporție de 1/500 000 permite dezvoltarea streptococilor, dar are o acțiune inhibantă asupra altor specii bacteriene.

Agarul cu singe defibrinat 1/10 și verde brilliant 1/40 000 se folosește pentru izolarea germenilor din genul *Campylobacter* (*Vibrio*). El constă în următoarele:

- bulion de carne 1 000,0 ml
- agar fibre 25,0 g
- peptonă Bacto 10,0 g
- NaCl 5,0 g
- verde brilliant 1/100 2,5 ml

Se ajustează pH-ul la 7,4—7,6 și în momentul turnării în plăci se adaugă singele.

Mediul Kaufmann-Müller este un mediu de îmbogățire, folosit mai ales pentru izolarea germenilor din genul *Salmonella* în cazul când în materialul patologic (fecale) ei se găsesc în număr redus. El se compune din:

- bulion 90,0 ml
- carbonat de calciu 5,0 g
- bilă de bou sterilizată 5,0 ml

Se sterilizează amestecul timp de 30 minute la 120°C, se lasă să se răcească și se adaugă în condiții de sterilitate:

- soluție apoasă de verde brilliant 1‰ 1,0 ml
- soluție Lugol 2,0 ml
- soluție de tiosulfat de sodiu 50% 2,0 ml

Se repartizează în tuburi sterile câte 10—15 ml și se incubează la 37°C timp de 48 de ore pentru controlul sterilității.

Mediul cu selenit de sodiu (Leifson) are aceleași indicații ca și precedentul și se prepară din:

— biselenit de sodiu anhidru	0,6 g
— fosfat disodic ($12 \cdot H_2O$)	0,5 g
— lactoză	0,4 g
— peptonă	0,4 g
— apă distilată	100,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7, se sterilizează prin fierbere 5 minute și se repartizează în tuburi sterile.

Mediul Chapman lichid este un mediu de îmbogățire hiperclorurat care permite dezvoltarea stafilococilor patogeni din diferite produse patologice. Constă din:

— extract de carne	4,0 g
— peptonă Witte	10,0 g
— NaCl	150,0 g
— lactoză	15,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Soluția de lactoză se prepară separat, în 100—150 ml apă distilată. Celelalte substanțe se dizolvă la cald în restul de apă distilată, se corectează pH-ul la 7,6. Se autoclavează 30 minute la 120°C. Se filtrează prin hîrtie de filtru, se adaugă soluția de glucoză și se sterilizează din nou prin autoclavare la 110°C timp de 20 minute.

Mediul Chapman solid servește la diferențierea stafilococilor patogeni de cei saprofiți și în același timp, prin conținutul de clorură de sodiu are proprietăți selective pentru stafilococi față de alte specii bacteriene. Conține:

— extract de carne	8,0 g
— peptonă	9,0 g
— clorură de sodiu	75—100 g
— manitol	10—100 g
— agar fibre	15—30 g
— roșu fenol	0,025—0,25 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă extractul de carne, peptona, clorura de sodiu, ajustîndu-se pH-ul la 7,6 și se autoclavează 20 minute la 110°C. Se topește și se adaugă soluția de manită și roșu de fenol. Soluția de roșu fenol se prepară din 0,1 g roșu fenol + 5,7 ml NaOH n/20 + 35 ml apă distilată. Manita se prepară prin dizolvarea 1/10 în apă distilată.

Mediul are o culoare roșie. Stafilococii, care fermentează manitolul, determină virarea culorii mediului spre galben, în timp ce cei saprofiți nu modifică culoarea mediului.

Mediul Istrate-Meitert este un mediu selectiv, folosit pentru diferențierea coloniilor de *Salmonella*, *E.coli* și *Proteus*. Este format din:

— agar nutritiv 2%	100,0 ml
— bilă de bou uscată la 105°C	0,3 g
— lactoză	1,5 g
— citrat de sodiu crist.	0,8 g

- tiosulfat de sodiu crist. 0,95 g
- citrat de fier 0,2 g
- soluție de albastru de bromtimol 1/500 4,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7,3—7,4 cu NaOH 10%. Mediul se fierbe 15 minute în baia de apă, se lasă să se răcească la 55°C și se toarnă în plăci Petri. El are o culoare verde și trebuie folosit în decurs de maximum 48 de ore de la preparare. Pe acest mediu care, neînsămînțat, are culoarea verde, coloniile de *Salmonella* apar albastre-verzui, cele de *E. coli* apar galbene și cele de *Proteus* albastre-verzui, cu centrul mai opac, neînvadante.

Mediul Gassner se folosește în același scop ca și precedentul. Se prepară din:

- agar nutritiv 2 000,0 ml
- soluție de Metachromgelb 2% 125,0 ml
- soluție Wasserblau 1% 175,0 ml
- lactoză 10,0 g

Se topește agarul, se prepară soluția de Metachromgelb care se filtrează și se fierbe 2 minute, iar separat se prepară soluția Wasserblau, care se filtrează, apoi se adaugă lactoza și se fierbe 10 minute. La agarul topit se adaugă mai întâi soluția de Metachromgelb și apoi cea de Wasserblau. Culoarea mediului este verde-albăstrui. În urma dezvoltării germenilor pe suprafața acestui mediu, culoarea virează spre galben în dreptul coloniilor de *Salmonella* și în albastru intens în dreptul celor de *E. coli*.

Mediul Drigalski se folosește pentru diferențierea speciilor lactozopozitive de cele care nu fermentează lactoza (*Salmonella*).

La o cantitate de geloză 3% topită se adaugă 1% lactoză și turnesol în soluție de 10% pînă ce mediul capătă o culoare violet-ametist. Se repartizează în cutii Petri, se controlează sterilitatea prin termostatare.

Dacă se adaugă mediului și o soluție de cristal violet, el dobîndește o valoare selectivă.

Agarul Mac Conkey este un agar selectiv ce se folosește cu bune rezultate pentru izolarea și cultivarea enterobacteriaceelor din diferite materiale patologice, alimente, ape etc. Prin sărurile biliare și cristalul violet ce le conține, inhibă germenii Gram pozitivi și pe cei aparținînd altor genuri decît enterobacteriaceele. Prin conținutul de lactoză permite de asemenea diferențierea coloniilor lactozo-pozitive și negative. Se compune din:

- peptonă (din caseină) 17,0 g
- peptonă (din carne) 3,0 g
- lactoză 10,0 g
- bilă uscată 1,5 g
- NaCl 5,0 g
- roșu neutru 0,03 g
- cristal violet 0,001 g
- agar-agar 13,5 g
- apă distilată 1 000,0 ml

pH-ul final este 7,1. Salmonellele și shigelele cresc sub formă de colonii incolore transparente, *E. coli*, sub formă de colonii mari roșii cu halou opac, *Klebsiella* și *Enterobacter*, sub formă de colonii mari, de

culoare roz, mucoase, enterococii și stafilococii sub formă de colonii mici, izolate, opace.

Geloza cu sînge Zeissler se folosește pentru izolarea unor germeni care nu cresc de la început pe medii obișnuite (streptococi, corynebacterii), pentru a testa capacitatea hemolitică a unor tulpini (stafilococi, streptococi etc.) și pentru cultivarea germenilor anaerobi, cu condiția ca incubarea să se realizeze în anaerobioză. Se prepară astfel:

- geloză peptonată cu pH 7,2—7,4 100,0 ml
- glucoză soluție 20% sterilă 10,0 ml
- sînge de oaie sau cal, defibrinat 20,0 ml

Se topește geloză și se răcește la 56°C, se adaugă steril cu o pipetă soluția de glucoză, apoi sîngele defibrinat, amestecîndu-se încet. Apoi se repartizează în plăci Petri cîte 8—10 ml și se așază în poziție perfect orizontală pentru a asigura o uniformitate a grosimii stratului de mediu. Dacă fundul plăcilor este neregulat, se poate folosi turnarea prealabilă a unui strat de agar de egalizare, format din:

- NaCl 8,5 g
- fosfat disodic 0,5 g
- agar fibre 16,0 g
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Turnarea gelozei cu sînge se face peste agarul de egalizare, după solidificarea acestuia. Este recomandabil ca după ce agarul cu sînge s-a solidificat să se țină cîteva ore (2—4 ore) la termostat pentru a se elimina apa de condensare.

În cazul cultivării anaerobilor, plăcile însămînțate se incubează la anaerostat, sau mai simplu, se folosește următoarea metodă:

— după turnarea și solidificarea în plăci a agarului cu sînge se face însămînțarea, iar pe capacul plăcii se lipește cu ajutorul unor benzi de leucoplast o pungă de hîrtie conținînd următorul amestec:

- 0,2 g pirogalol
- 0,2 g carbonat de potasiu
- 0,3—0,4 g carbonat de calciu

sau:

- 0,3 g pirogalol
- 0,3 g carbonat de potasiu
- 1,4 g pămînt de infuzorii

Etanșizarea cu parafină, plastilină sau alt mijloc permite realizarea unui spațiu închis în care, prin reacția chimică ce are loc, oxigenul este consumat, anaerobii dezvoltîndu-se foarte bine. Mai practic este ca lipirea pungii să se facă pe partea externă a capacului după care acesta se întoarce, se pune cu punga spre interiorul plăcii însămînțate și se etanșează cu parafină.

Mediul Tittsler-Sandholzer se folosește pentru studiul mobilității bacteriilor. Se prepară astfel:

- bulion de carne 1 000,0 ml
- peptonă 5,0 g
- geloză pulvis 5,0 g

Se ajustează pH-ul la 7,2, se sterilizează și se repartizează în tuburi în poziție verticală. Însămînțarea se face prin înțepare în centrul mediului. La bacili mobili se observă difuzarea lor în mediu în toate direcțiile,

de la linia de însămînțare spre pereții tubului, dînd mediului un aspect opalescent. Bacilii imobili se dezvoltă exclusiv de-a lungul liniei de însămînțare. Servește de asemenea și pentru stabilirea afinităților față de oxigen, în sensul că germenii aerobi vor dovedi o dezvoltare mai intensă spre suprafața mediului, abundența scăzînd spre profunzime (aspectul de brad răsturnat), în timp ce la cei anaerobi situația este inversă.

Mediul pentru punerea în evidență a ureazei (Christensen) se folosește pentru punerea în evidență a capacității unor germeni de a descompune ureea, punînd în libertate apă, CO_2 și NH_3 . Se compune din:

— peptonă Bacto	0,5 g
— NaCl	2,5 g
— KH_2PO_4	1,0 g
— glucoză	0,5 g
— apă distilată	500,0 ml

După dizolvarea ingredientelor, se fierbe și se adaugă 3 ml dintr-o soluție de roșu fenol 1/500, ca indicator. După autoclavare și răcire, se adaugă 10 g uree (dizolvată în prealabil în apă distilată și sterilizată prin filtrare prin filtru Seitz). Mediul are o culoare gălbuie.

Indicatorul din mediu, în prezența unor germeni care hidrolizează ureea, datorită amoniacului ce rezultă, virează spre roșu-violet intens (salmonenele = negativ, *Proteus* = pozitiv).

Mediul Fergusson se folosește pentru testarea capacității ureazice a bacteriilor. Se compune din:

— uree	2,0 g
— fosfat monopotasie	0,1 g
— fosfat bipotasie	0,1 g
— NaCl	0,5 g
— alcool 95°	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Ca indicator se adaugă roșu de fenol în proporție de 0,2%. Mediul are o culoare galbenă. Dacă tulpina microbiană însămînțată produce urează, ureea se descompune și culoarea mediului virează în violet.

Bulionul cu uree se folosește pentru punerea în evidență a ureazei. Se compune din:

— extract de drojdie	0,1 g
— KH_2PO_4	9,1 g
— Na_2HPO_4	9,5 g
— uree	20,0 g
— roșu fenol	0,01 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Mediul se sterilizează prin filtrare, pH-ul fiind în final de 6,8. Se repartizează cîte 3 ml în tuburi de reacție.

Se poate recurge și la dizolvarea ingredientelor, cu excepția ureei, în 900 ml apă distilată urmată de sterilizare. După răcire se adaugă 100 ml soluție 20% uree sterilizată prin filtrare. După omogenizare se repartizează steril cîte 3 ml în tuburi de reacție.

Însămînțarea se face abundent, din culturi pe mediu solid, pentru a obține o suspensie densă. Se incubează la baia de apă la 37°C și se interpretează rezultatul după 10 minute, 60 minute, 2 ore, 8 ore, 12 ore și 24 ore.

Reacția pozitivă constă în colorarea mediului în roșu. Reacția negativă este exprimată de păstrarea culorii inițiale (galbenă) a mediului.

Mediul multitest SIM (Costin 1969) se folosește pentru identificarea enterobacteriaceelor, permițând punerea în evidență a indolului, hidrogenului sulfurat și mobilității. Culturile folosite trebuie să fie pure.

Compoziție:

— peptonă (din caseină)	20,0 g
— peptonă (din carne)	6,0 g
— citrat feric amoniacal (III)	0,2 g
— tiosulfat de sodiu	0,2 g
— agar-agar	3,0 g
— apă distilată ad	1 000,0 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată prin încălzire pînă la fierbere, se repartizează în tuburi în așa fel încît înălțimea mediului să fie de cca 4 cm. Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C și se solidifică în poziție verticală. În final pH-ul trebuie să fie de $7,3 \pm 0,1$ la 37°C.

Însămînțarea prin puncție este urmată de incubare timp de 18—24 ore la 37°C.

Mobilitatea este indicată de o turbiditate difuză în jurul liniei de însămînțare în timp ce lipsa mobilității, de creșterea strict de-a lungul liniei, fără difuziune în jur. Producția de H_2S este exprimată de înnegrirea de-a lungul liniei de însămînțare sau în jurul acesteia. Adăugînd peste mediu reactiv Kovacs, colorarea purpurie a acestuia relevă prezența indolului.

Mediul Kligler este un mediu solid multitest, ce se folosește în diferențierea germenilor Gram negativ pe baza capacității lor de a produce H_2S și de a fermenta lactoza și glucoza. Se prepară din:

— extract de carne	3,0 g
— extract de drojdie	3,0 g
— peptonă din cazeină	15,0 g
— peptonă din carne	5,0 g
— lactoză	10,0 g
— glucoză D	1,0 g
— citrat feroamoniocal	0,5 g
— NaCl	5,0 g
— tiosulfat de sodiu	0,5 g
— roșu fenol	0,024 g
— agar	12,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7,4 și se repartizează câte 4 ml în tuburi de 120/12 ml. Se sterilizează 15 minute la 115°C, se solidifică înclinat, în așa fel încît să se obțină o coloană compactă de 1—1,5 cm și o pantă.

Însămînțarea se face din cultura pe mediu solid — coloana prin înțepare, iar panta în suprafață. Incubarea se face la 37°C timp de 24 de ore. La interpretare se vor avea în vedere aspectele furnizate de coloană și de pantă:

- coloana:
 - nemodificată: (roșie) glucoza nu a fost fermentată
 - galbenă: glucoza a fost fermentată

- cu producție de gaz
- fără gaze
- panta:
 - nemodificată (roșie): lactoza nu este fermentată
 - galbenă: lactoza este fermentată

Producția de H_2S este sugerată de apariția unui inel negru la partea superioară a coloanei sau înnegrirea întregii coloane de mediu.

Mediul pentru punerea în evidență a scindării gelatinei și producerea de H_2S . Se compune din:

- | | |
|----------------------|------------|
| — bulion de carne | 1 000,0 ml |
| — extract de drojdie | 10,0 ml |
| — peptonă purificată | 10,0 g |
| — gelatină | 30,0 g |

După filtrare, se sterilizează și apoi se adaugă la fiecare 100 ml câte 1 ml $Na_2S_2O_3$ soluție 2%, 0,05 g sulfat feroamoniocal. Se fierbe 20 de minute și se repartizează în tuburi sterile, câte 10 ml. Însămînțarea se face cu un ac de însămînțare fără ansă (prin înțepare).

Incubația timp de câteva zile presupune urmărirea eventualei lichefierii a mediului. Citirea se face întotdeauna față de tub martor neînsămînțat și după o prealabilă menținere la frigider. În caz pozitiv, în tuburile însămînțate agarul este lichefiat.

Mediul cu subacetat de plumb se folosește pentru punerea în evidență a bacteriilor care produc H_2S . În acest scop, se topesc, prin fierbere, un număr de tuburi cu geloză simplă 2% și se adaugă steril fiecărui tub câte 0,1 ml dintr-o soluție apoasă sterilă 10% de subacetat de plumb. Se amestecă prin agitare și se lasă să se solidifice în poziție verticală. Însămînțarea se face prin înțepare. Tulpinile care produc H_2S înnegresc mediul în zonă de creștere a culturii.

Mediul pentru punerea în evidență a reducerii nitraților în nitriți, se folosește pentru identificarea acelor bacterii care au enzime capabile să reducă nitrații în nitriți și se compune fie din bulion la care se adaugă azotat de potasiu (NO_3K) în proporție de 0,2% fie din următoarea compoziție:

- | | |
|-----------------|------------|
| — peptonă | 10,0 g |
| — NO_3K | 10,0 g |
| — apă distilată | 1 000,0 ml |

După încălzirea mediului în scopul dizolvării substanțelor, acesta se sterilizează prin tindalizare și se repartizează în tuburi.

Mediul însămînțat se controlează după 3—5 zile de incubare, prin adăugarea a câte 5 picături din reactivul Griess-Ilosvay. În cazul reacției pozitive, după adăugarea reactivilor, mediul se colorează în roșu, iar dacă nu a avut loc reducerea, culoarea nu se modifică.

Se poate folosi și un mediu solid având următoarea compoziție:

- | | |
|---------------------|--------|
| — extract de carne | 3,0 g |
| — peptonă | 5,0 g |
| — azotat de potasiu | 1,0 g |
| — agar-agar | 12,0 g |

Dizolvarea ingredientelor este urmată de sterilizarea la autoclav, repartizarea în tuburi și solidificarea în poziție înclinată. Însămînțarea în suprafață permite observarea producției de gaze prin apariția de crăpă-

turi în mediu. La adăugarea câtorva picături de reactiv Griess-Ilosvay, colorarea în roșu indică o reacție pozitivă.

Mediul cu citrat de sodiu Simmons se folosește pentru testarea capacității unor bacterii de a utiliza citratul ca substrat nutritiv. Se compune din:

— clorură de sodiu	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,2 g
— fosfat de amoniu biacid	1,0 g
— citrat de sodiu crist.	2,77 g
— agar	20,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă întâi ingredientele, se încălzește amestecul pînă la topirea gelozei, se stabilește pH-ul la 7,2, se adaugă 10 ml dintr-o soluție de albastru de bromtimol 1,5%. Se filtrează, se repartizează, se sterilizează la 120°C timp de 15 minute, se repartizează și se solidifică în plăci Petri sau în tuburi (în poziție înclinată). Pe acest mediu unele bacterii nu se dezvoltă, în timp ce altele se dezvoltă bine și prin alcalinizarea lui determină modificarea culorii acestuia în albastru intens. Reacția pozitivă este dată de colorarea de la verde la albastru a mediului în timp ce o reacție negativă este indicată de rămînerea neschimbată a culorii și nedezvoltarea culturii.

Mediul cu citrat Koser se folosește în același scop ca și precedentul și constă în:

— NaCl	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,2 g
— fosfat de amoniu	1,0 g
— fosfat bipotasic	1,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

După dizolvarea ingredientelor se ajustează pH-ul la 6,8 și se adaugă 2,0 g de acid citric. Se reajustează pH-ul la 6,8 și se repartizează în tuburi câte 5 ml. Se sterilizează 10 minute la 115°C.

Însămînțarea se face cu ansa dintr-o suspensie în soluție salină fiziologică sterilă a unei culturi tinere pe agar sau direct din cultura pe agar. Incubarea la 37°C timp de 4 zile este urmată de interpretare.

Reacția pozitivă este dată de dezvoltarea culturii și tulburarea mediului, iar reacția negativă de aspectul limpede al acestuia.

În interpretarea rezultatelor însămînțărilor pe mediile enunțate se au în vedere o serie de însușiri morfologice, culturale, biochimice ale germenilor care s-au dezvoltat, ele coroborîndu-se eventual, cu datele de patogenitate și antigenitate.

Examenul caracterelor culturale

Dezvoltarea germenilor bacterieni pe mediile de cultură ia aspecte diferite în funcție de specia în cauză, mediul folosit și uneori condițiile de cultivare. Pentru unele specii, o serie de caractere culturale reprezintă particularități deosebit de prețioase pentru identificarea lor.

În mediile lichide, în aprecierea dezvoltării bacteriilor se au în vedere turbiditatea, depozitul și formațiunile de suprafață.

Turbiditatea poate fi pronunțată, discretă sau poate să lipsească.

Depozitul ia naștere prin depunerea la fundul tubului a germenilor care s-au dezvoltat în mediu. El poate fi discret sau abundent, granular, viscos sau pulverulent, omogenizabil sau neomogenizabil prin agitare, aderent sau nu la fundul tubului.

Suprafața mediului poate oferi aspectul unei membrane de grosimi variabile, rugoasă, granulară, încrețită sau netedă, sau al unui inel de grosimi variabile la suprafața lichidului.

Pe mediile solide, germenii constituie, prin multiplicare, aglomerări cunoscute sub numele de colonii, vizibile cu ochiul liber sau cu lupa. În aprecierea lor, se au în vedere: dimensiunile, forma în ansamblu, profilul, suprafața, marginile, culoarea, opacitatea, consistența, emulsionabilitatea.

Sub aspectul dimensiunii, coloniile pot fi de talie variabilă, pînă la cîțiva milimetri diametru.



Fig. 21 — Formarea de membrană la suprafața mediului de cultură și căderea la fundul eprubetei a fragmentelor de cultură (*M. avium*)

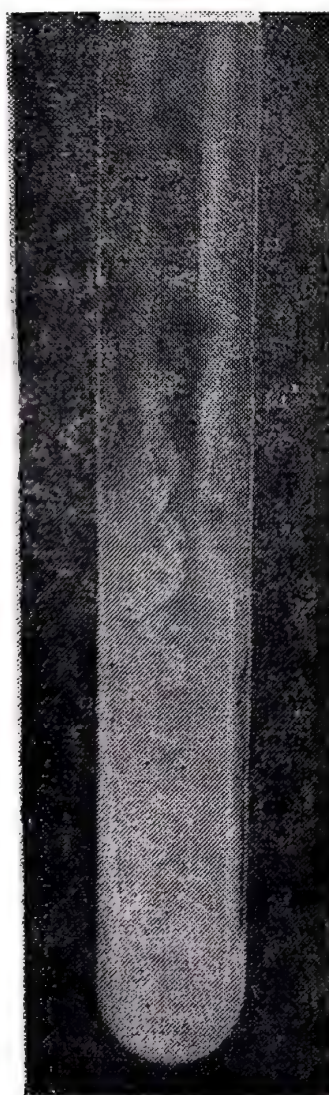


Fig. 22 — Cultură de *M. avium* pe mediu solid

Forma poate fi circulară, ovalară, radiată sau neregulată.

Profilul (în secțiune prezumtivă) poate avea un aspect plat, convex, concav, ombilicat, mamelonat sau papiliform.

Suprafața poate fi netedă, aspră, granulară, lucioasă sau mată.

Marginile pot fi uniforme, neregulate sau cu prelungiri.

Culoarea coloniilor este diferită în funcție de prezența și natura pigmentului pe care eventual îl conțin (alb, galben, verde, roșu, portocaliu etc.).

Sub raportul opacității, coloniile pot fi translucide sau opace, între ele existînd grade intermediare.

Consistența este și ea variabilă: untoasă, viscoasă, uleioasă, grunjoasă, friabilă, filantă, ea determinînd cel mai adesea și gradul de aderență la suprafața mediului. În timp ce coloniile de consistență untoasă și granulară se desprind cu ușurință, cele viscoase aderă, determinînd o dificultate în desprinderea lor.

Emulsionabilitatea poate fi ușoară sau dificilă și face ca suspensiile care se practică să fie omogene sau neuniforme. Cîteva exemple în acest sens, pot fi edificatoare.

În medii lichide:

- mediul poate fi tulbure omogen (salmonelle, stafilococi);
- mediul poate fi tulbure cu un inel pe perete la limita superioară a mediului (*E. coli*);
- mediul poate fi clar, însă la fund prezintă un depozit grunjos sau nisipos (streptococi);
- mediul poate fi clar, cu un depozit floconos și aderent la fundul tubului (bacilul antraxului);
- mediul prezintă un vâl subțire la suprafață (vibrionul holerici);
- mediul prezintă o membrană uscată la suprafață (*Bacillus subtilis*);
- mediul prezintă o membrană groasă, rugoasă, plisată la suprafață, restul lichidului rămînînd limpede (*M. tuberculosis*);
- mediul este colorat în verde-albăstrui (b. piocianic).

Pe medii solide:

- *E. coli* dă colonii rotunde cu margini și suprafețe netede de 3—5 mm diametru, de culoare albă-lăptoasă, lucioase;
- *Pasteurella* dă, de regulă, colonii mici, abia vizibile, transparente, uneori ușor albăstrui, aderente la mediu;
- b. antraxului dă colonii cu suprafața aspră și cu margini avînd prelungiri laterale, efilate, care privite cu lupa, au aspectul unor ondulații ale firelor de păr;
- stafilococii dau colonii rotunde, bombate, cu margini și suprafețe netede, unele din ele pigmentate în alb, auriu sau citrin;
- streptococii dau colonii mici bombate;
- b. tuberculozei umane produce colonii rugoase, uscate, cu margini neregulate.

Bacteriile anaerobe oferă și ele aspecte variabile în funcție de mediul folosit în cultivarea lor.

În cazul mediilor lichide, în general, se produce o tulburare uniformă cu sau fără producție de gaze, vizibile sub forma unor bule fie în intimitatea lui, fie la suprafață.

În cazul mediilor semisolide (geloza Veillon) se pot forma două tipuri de colonii, în funcție de difuzibilitatea germenilor în mediu, însușire

legată de prezența mobilității. Bacteriile mobile (*Cl. tetani*, *Cl. chauvoei*) produc colonii pufoase de aspect sferoid, în timp ce cele imobile (*Cl. perfringens*) produc colonii de aspect lenticular, de talie variabilă. Unele din ele au mameloane centrale caracteristice, altele pot determina lichefierea parțială sau totală a mediului.

Examinarea caracterelor metabolice (biochimice) ale germenilor bacterieni

Caracterele morfo-culturale au o valoare importantă, dar nu totdeauna concludentă și pentru a confirma datele pe care ele le furnizează este nevoie să se recurgă și la alte mijloace suplimentare. Ele se bazează pe anumite particularități metabolice, cum ar fi de exemplu capacitatea de a fermenta anumite zaharuri, de a produce H_2S , indol, urează, de a reduce nitrații, de a produce hemoliza, de a coagula plasma, de a elabora toxine etc.

Aceste caractere sînt variabile cu specia microbiană și chiar cu tulpina și au la bază existența unui echipament enzimatic diferit, care le conferă capacitatea de a acționa asupra unor substanțe conținute în mediu sau de a elabora, în cursul multiplicării lor, anumite substanțe noi, identificabile prin diverse reacții chimice.

În funcție de natura enzimelor bacteriene și a substanțelor asupra cărora acestea activează, reacțiile biochimice pot fi diferite.

Reacții de punere în evidență a capacității zaharolitice (fermentarea zaharurilor)

Fermentarea zaharurilor se datorește elaborării de către germeni a unor enzime capabile să scindeze glucidele, cu formarea de aldehide, acizi și gaze (CO_2 , H_2 , CH_4). Ea se determină prin folosirea unor medii lichide (cel mai frecvent) sau solide, la care se adaugă diferite zaharuri și un indicator care să releve transformările biochimice care survin (de obicei modificarea de pH a mediului).

Substanțele hidrocarbonate care se folosesc cel mai frecvent în acest scop sînt: glucide: dizaharide (maltoza, lactoza, zaharoza sau sucroza); trizaharide (rafinoza); pentoze (arabinoza, xiloza, ramnoza); hexoze (glucoza sau dextroza, levuloza sau fructoza, manoza, galactoza); polizaharide (inulina, amidonul, glicogenul); glicozide (salicina, esculina); polialcooli: alcooli trivalenți (glicerina); alcooli tetravalenți (aritrina); alcooli penta-valenți (adonita); alcooli hexavalenți (manita, dulcita, sorbita, inozita).

Dintre mediile lichide, cel mai frecvent folosită pentru evidențierea însușirilor zaharolitice este apa peptonată, în care se dizolvă, în proporție de 10%, substanța hidrocarbonată urmărită și o soluție indicatoare (albastru de bromtimol, tinctură de turnesol, roșul neutru). Mediul se repartizează de preferință în tuburi de reacție tip Wassermann.

În mediul zaharat, însămînțarea tulpinii bacteriene de cercetat (de pe un mediu solid, cu ajutorul ansei bacteriologice) se soldează cu virarea

culorii mediului, în caz că s-a produs fermentarea, sau cu păstrarea culorii inițiale dacă aceasta nu s-a produs. Modificarea culorii mediului are loc în timpul incubăției la 37°C, după o perioadă variabilă, în funcție de rapiditatea cu care fenomenele fermentative au loc. La unele specii, aceasta se produce după câteva ore, în timp ce la altele este nevoie de o incubăție mai îndelungată, de câteva zile sau chiar săptămîni. În acest din urmă caz, pentru a se evita evaporarea mediului, dopurile tuburilor se parafinează sau se recurge la un procedeu de incubare în tuburi închise la flacără. Pentru aceasta, din sticla pentru pipete Pasteur, se pregătesc prin efilare la flacără pipete cu bulă, avînd ambele capete închise (mărimea bulei este de cca 1 cm iar capetele de 6—7 cm fiecare). Ele nu mai trebuie sterilizate deoarece încălzirea la flacără realizează acest deziderat.

În momentul folosirii, se rup ambele capete și se flambează, în flacără, după care se extrage din mediul zaharat o cantitate de lichid pînă la umplerea bulei. Se închid apoi capetele prin efilare (tubul fiind foarte subțire operațiunea se realizează cu ușurință). Din fiecare mediu zaharat se umplu atîtea pipete cîte tulpini se cercetează. Apoi, se rupe unul din capetele efilate și cu ajutorul unui ac de însămînțare fără ansă, flambat în prealabil și răcit, se ia o cantitate mică de cultură de pe mediul solid și se introduce prin capătul rupt al pipetei efilate, pînă în mediul conținut în bula pipetei. Apoi pipeta se închide din nou prin efilare la flacără. În mod similar, se procedează și cu celelalte pipete conținînd zaharuri diferite. Pipetele însămînțate și închise se pun apoi în stative speciale prevăzute cu orificii corespunzătoare părții efilate, în așa fel încît bulele rămîn la nivelul platformei stativului. Pentru recunoașterea tulpinilor și a zaharurilor puse în lucru, pe marginea stativului sînt notate indicativele necesare (de exemplu, pe una din laturi se indică zaharurile, iar pe latura perpendiculară pe prima, numărul tulpinii). Interpretarea este identică cu aceea din tuburi, luîndu-se ca criteriu modificarea culorii mediului.

La unele bacterii, fermentarea substanțelor hidrocarbonate este însoțită de producerea de gaze. Pentru a evidenția acest caracter, în tuburile

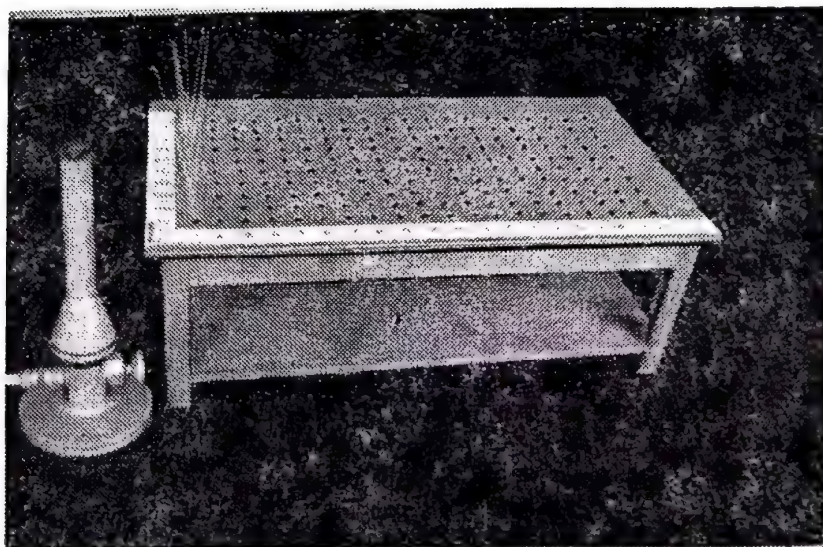


Fig. 23 — Stativ pentru pipete închise, folosite în determinarea însușirilor zaharolitice la bacterii

conținând mediul zaharat se introduc, înainte de sterilizare, cu gura în jos, tubulețe Durham. În caz pozitiv, în acestea se acumulează gaze, care pot fi ușor observate, iar dacă sînt abundente determină chiar ridicarea spre suprafață a tubului Durham.

Mediile solide, folosite pentru a evidenția capacitatea fermentativă a bacteriilor, au înglobate în ele zahărul respectiv și un indicator, care relevă prin virarea culorii prezența procesului de fermentare (în practică se folosesc numai cîteva medii de largă circulație, pentru diferențierea unor germeni ca *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*).

Pentru a evidenția capacitatea de a hidroliza amidonul, prezintă la unele bacterii, acestea se însămîntează în plăci cu geloză conținind 0,2% amidon solubil. După dezvoltarea culturii, suprafața mediului se acoperă cu soluție Lugol sau soluție saturată de iod (20 g iod și 100 ml alcool etilic de 50°). În cazul existenței unor colonii care au determinat hidroliza amidonului, în jurul acestora mediul rămîne necolorat, contrastînd cu restul mediului care apare de culoare albastră-violacee.

Reacții prin care se pune în evidență existența fermenților activi față de substanțele proteice și aminoacizi și existența unor produși rezultați din dezintegrarea substanțelor proteice

Testul de gelatinoliză folosește un mediu cu gelatină, preparat astfel: la 100 ml bulion obișnuit și încălzit la 55°C se adaugă, foiță cu foiță, 10—15 g gelatină și 7,5 ml dintr-un amestec rezultat din omogenizarea unui albuș de ou cu 50 ml apă distilată. Se încălzește 15 minute la 115°C. Albușul de ou, prin coagulare, antrenează toate substanțele nedizolvate din mediu, clarificîndu-l. Se fitrează prin vată, se distribuie în tuburi și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute, după care se lasă să se solidifice în poziție verticală.

Însămîntarea se face prin înțepare, prin introducerea acului în centrul mediului, astfel ca să ajungă pînă la fundul tubului. Incubația se face la 20—22°C urmărindu-se caracterul creșterii și producerea lichefierii la diferite intervale de timp. Aspectele sînt diferite, în funcție de specie: dezvoltarea fără lichefiere, dezvoltarea în formă de perie de spălat eprubete, în formă de brad răsturnat, aspect filiform, dezvoltarea cu lichefiere, aspect de pîlnie, infundibuliform, napiform, de cupă etc.

Dacă germenul nu se dezvoltă la 20°C se poate recurge la incubația la 37°C, în acest caz fiind necesară ținerea culturilor la frigider înainte de interpretarea rezultatelor.

Testul permite diferențierea unor specii bacteriene (*streptococi* —, *salmonella* +, *E. coli* —, *Shigella* —, *Pasteurella* —) sau a prezenței altor însușiri (la stafilococi numai tulpinile patogene dețin capacitatea gelatinolitică).

Testul de lichefiere a serului coagulat se folosește pentru punerea în evidență a însușirilor proteolitice ale bacteriilor. Pentru prepararea serului coagulat, se recoltează sîngele în condiții aseptice și se distribuie în tuburi sterile. Coagularea se realizează prin încălzirea la 75°C în poziție înclinată. Rezultă un mediu de culoare albă-cenușie. Însămîntarea în suprafață se soldează, în cazul bacteriilor proteolitice, cu formarea unor depresiuni în dreptul coloniilor.

Testul cultivării bacteriilor în lapte se folosește pentru a observa modificările pe care dezvoltarea germenilor le antrenează prin multiplicare. În acest scop, laptele se degresează la separator sau prin separarea spontană a grăsimii. Se controlează pH-ul care trebuie să fie în jurul neutralității. Se repartizează în eprubete, se sterilizează prin tindalizare la 100°C cîte 30 minute sau la 110°C o singură dată timp de 20 minute (nu se sterilizează la 115°C pentru că la această temperatură cazeina se peptonizează, lactoza se caramelizează și mediul dobîndește o culoare galbenă). Pentru a putea observa modificările de pH se adaugă la mediu o soluție apoasă de tinctură de turnesol 10% sterilă, pînă cînd se obține o culoare violetă.

Însămînțarea tuburilor cu lapte poate avea ca urmare lipsa oricărei modificări, coagularea fără acidifiere, coagularea însoțită de acidifiere sau alcalinizarea laptelui, sau acidifiere, urmată de coagulare și ulterior de peptonizare.

Testul de hidroliză a cazeinei. La geloza repartizată în tuburi, sterilizată și lichefiată, se adaugă lapte steril, degresat, în cantitate de 1—2 ml la 10 ml mediu. Amestecul se repartizează în plăci Petri. În sămînțarea se face în suprafață. În cazul germenilor proteolitici, cazeina din lapte se hidrolizează și, în jurul colonilor, mediul se clarifică.

Testul de hemoliză se folosește pentru a determina capacitatea de a hemoliza globulele roșii aparținînd unor specii variate (cal, oaie, bovine, cobai, iepure, om). Însoșirea este prezentă numai la unele specii sau tulpini bacteriene și este adesea legată de patogenitatea acestora. Astfel, în cazul *E. coli*, tulpinile izolate din procese inflamatorii au această capacitate, în timp ce cele puțin sau deloc patogene nu o au. Capacitatea hemolizantă este prezentă în diferite grade și la unele tulpini de streptococi, corynebacterii, stafilococi, listerii, pasteurele (*hemolytica*), *Cl. perfringens*, specii din genul *Bacillus*.

Efectul hemolitic poate îmbrăca diferite aspecte în funcție de specie și tulpina în cauză. De exemplu, în cazul streptococilor, hemoliza poate fi:

— de tip alfa, care se caracterizează prin producerea în dreptul și în jurul coloniei a unei decolorări mai mult sau mai puțin întinse, în-



Fig. 24 — Hemoliză

soțită de o înverzire a mediului, datorită modificărilor chimice de oxidare ale hemoglobinei (efectul viridans); zona respectivă arată o hidroliză adevărată după o conservare de 24 ore la frigider;

— de tip beta, care se caracterizează numai prin decolorarea mediului din dreptul și din jurul coloniei și denotă liza totală a globulelor roșii din zona respectivă.

Tulpinile care, pe medii cu sînge, nu au nici un fel de acțiune asupra globulelor roșii se numesc anhemolitice sau de tip gamma și caracterizează, de regulă, germenii lipsiți de patogenitate, atît în condiții experimentale cit și naturale.

În cazul stafilococilor, hemolizinele au o activitate diferită față de globulele roșii ale diferitelor specii animale, ceea ce a determinat clasificarea lor din acest punct de vedere în 3 categorii:

a) stafilococi secretori de hemolizine alfa, active față de globulele roșii de iepure;

b) stafilococi secretori de hemolizine beta, active față de globulele roșii de oaie;

c) stafilococi secretori de hemolizine gamma, active față de globulele roșii de iepure și foarte puțin față de cele de oaie.

Hemolizinele alfa se inactivează la 60°C și se pare că se reactivează printr-o reîncălzire la 100°C, în timp ce celelalte pierd numai parțial activitatea lor la 56—60°C și se inactivează total la 100°C. Efectul hemolitic al toxinei de tip beta se accentuează la ghețar.

Pentru stabilirea capacității hemolitice, însămînțarea se face în suprafață, pe plăci Petri, pe mediul conținînd sînge defibrinat de diferite specii (bovine, ovine, iepure, cal, om) în proporție de 5%. Citirea se face după o incubatie de 24 de ore la 37°C.

Proba activității hemolizante se poate face și în mediu lichid, metodă prin care se poate realiza și titrarea capacității hemolitice. În acest scop, se amestecă în părți egale 0,5 ml cultură de 15 ore în bulion (sau bulion cu ser în cazul germenilor serofili) cu 0,5 ml suspensie 5% de globule roșii. Amestecul se ține 90 de minute la 37°C. Tulpinile care secretă hemolizine filtrabile, deci aparținînd tipului beta, hemolizează în acest interval globulele roșii, lichidul clarificîndu-se. Pentru titrare se realizează amestecuri cu concentrații descrescînde de cultură (0,5; 0,1; 0,01 etc.) cu un volum constant de suspensie de globule roșii.

Testul indolului. Indolul rezultă din dezintegrarea triptofanului. Pentru punerea lui în evidență se preferă culturile bacteriene în apă peptonată fără zaharuri, care oferă rezultate mai fidele. Se folosesc în acest scop diferiți reactivi (reactivul Ehrlich-Böhme, reactivul Ehrlich modificat de Kovacs, reactivul Kovacs-Hoffmann) sau hîrtii indicatoare, impregnate cu indicatori (Pingsheim, Kovacs).

Cel mai frecvent se folosește reactivul Ehrlich-Kovacs, care se adaugă cu ajutorul unei pipete, la o cantitate de 1—2 ml cultură proaspătă de 24 ore în apă peptonată, atît cît să formeze un strat de 1—2 mm la suprafața mediului. Colorarea stratului de reactiv în roșu-închis (din galben-deschis) este indiciul unei probe pozitive.

În cazul folosirii hîrtiei impregnate, aceasta se pregătește astfel:
— se taie benzi de hîrtie de filtru lungi de cca 5 cm și late de 5—7 mm;

— se ımbibă cu reactiv Kovacs proaspăt preparat sau reactiv Gilies;

— se usucă și se păstrează în sticle brune la loc uscat și ıntuneric.

Benzile se fixează cu ajutorul dopului la tuburile ınsămınțate cu tulpina de cercetat în mediu de apă peptonată. În cazul unei reacții pozitive, banda se colorează roșu sau roz. Dacă reacția este negativă se execută și reacția după tehnica anterioară.

Acest test permite diferențierea salmonelelor și klebsielelor (indol-negative) de colibacili și pasteurele (indol-pozitive). Reacții pozitive dau și germenii din genurile *Proteus* (rettgeri), *Providencia*, iar negative — *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*.

În cazul hirtiei indicatoare, fișii de hirtie de filtru impregnate cu reactivul respectiv și uscate se ımbibă cu cultura microbiană urmărindu-se modificarea culorii acesteia.

Se poate recurge și la folosirea unor medii complexe (multitest) care permit punerea în evidență a indolului și eventual a altor produse de dezasimilație.

Testul de evidențiere a H_2S permite stabilirea capacității unor bacterii de a dezintegra aminoacizii care conțin sulf (cistina, cisteina etc.) sub acțiunea unor enzime specifice.

În acest scop se pot folosi medii cu acetat de plumb sau benzi impregnate cu aceeași substanță.

În primul caz, pe medii solide cu acetat de plumb (tuburi sau plăci Petri) se face ınsămınțarea bacteriilor de cercetat și se incubează la $37^{\circ}C$. Dacă ele produc H_2S , mediul se ınnegrește în jurul coloniilor H_2S -pozitive, din cauza sulfurii de plumb care rezultă.

În cel de al doilea caz, benzi de hirtie de filtru de 6—8 cm lungime și 8—10 mm lățime, se ımbibă cu o soluție 10% de acetat de plumb, după care se usucă, se introduc în tuburi sau flacoane și se sterilizează la autoclav. Benzile astfel pregătite se introduc în tuburile cu mediul de cultură, pînă la ınălțimea de aproximativ 1 cm deasupra suprafeței mediului. În cursul incubăției, dacă germeul produce H_2S , banda se ınnegrește în porțiunea inferioară, pe o lungime mai mare sau mai mică, în funcție de cantitatea de gaz degajată. Timpul de ınnegrire este variabil de la cîteva ore la cîteva zile.

Germenii aparținînd genurilor *Salmonella*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, produc H_2S în timp ce alții (*Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stafilococcus*, bacilul morvei etc.) nu produc H_2S .

Testul de hidroliză a ureei se face prin cultivarea germenilor pe anumite medii speciale (Christensen, Fergusson, bulion cu uree). În urma ınsămınțării, bacteriile care hidrolizează ureea determină colorarea mediului respectiv în roșu (inițial este galben) datorită prezenței amoniacului rezultat din metabolizarea ureei. Germeni ai genului *Proteus* hidrolizează ureea în timp ce *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Providencia* sînt negative sau slab pozitive.



Fig. 25 — Punerea în evidență a H_2S cu ajutorul benzilor impregnate cu acetat de plumb

Reacții prin care se pun în evidență fermentii oxidoreductori

Testul de reducere a unor substanțe colorante se bazează pe proprietatea unor bacterii de a reduce coloranții organici transformându-i în leucobaze incolore. Acestea, în prezența oxigenului, redobîndesc culoarea inițială. Se folosesc în acest scop, albastru de metilen, verdele de malahit, indigo-carminul, molibdatul de amoniu.

La 5 ml de cultură de 24 ore în bulion, se adaugă o picătură din soluția apoasă 1% de colorant, sterilă. După omogenizare se adaugă câteva picături de oleu de parafină steril (dacă reacția se desfășoară în tub) sau se recurge la închiderea la flacără (dacă se folosesc fiole). După o incubare de 1—24 ore la termostat, se observă decolorarea mediului, care indică o reacție pozitivă.

Testul de reducere a nitraților în nitriți (denitrificare). Bacteriile de cercetat se cultivă în medii conținând nitrat de potasiu. După 3—5 zile de incubare, se adaugă câte 5 picături din cei doi reactivi Griess-Ilosvay. În caz pozitiv, mediul se colorează în roșu. Dacă reducerea nitraților nu a avut loc, culoarea mediului nu se modifică.

Testul Voges-Proskauer urmărește punerea în evidență a acetil-metil-carbinolului, un metabolit rezultat prin oxidarea butilenglicolului.

Folosește pentru cultivarea germenilor mediul avînd următoarea compoziție:

— peptonă Witte	5,0 g
— K_2HPO_4	5,0 g
— glucoză	5,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7,1, se filtrează, se autoclavează și se repartizează în tuburi.

La 2 ml de cultură de 3—4 zile pe mediul Voges-Proskauer se adaugă 1 ml dintr-o soluție alcoolică 6% de alfanaftol și 0,4 ml KOH. Reacția pozitivă se manifestă prin schimbarea culorii în roz-roșu în decurs de câteva minute pînă la câteva ore.

Testul cu roșu de metil se practică în același scop ca și reacția precedentă.

Se folosește în acest scop cultivarea germenilor pe un mediu avînd următoarea compoziție:

— peptonă specială	7,0 g
— glucoză	5,0 g
— fosfat bipotasic	5,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 6,9—7,0, se repartizează câte 5 ml în tuburi, se sterilizează 10 minute la 121°C. Însămînțarea se face cu o picătură din cultura tînă în apa peptonată sau cu ansa dintr-o cultură tînă pe agar înclinat. Se incubează 48 ore — 4 zile la 37°C după care se adaugă 5—6 picături din reactivul roșu metil, constituit din 0,1 g roșu metil, 300 ml alcool etilic 96° și 500 ml apă distilată. Reacția pozitivă

constă în colorarea în roșu a amestecului, reacția slab pozitivă în roșu-portocaliu și negativă în culoarea galbenă sau slab portocalie.

În mod similar se pot folosi și alți reactivi.

— Reactivul O'Meara constă din 40,0 g hidroxid de potasiu dizolvat în 100 ml apă distilată, la care după răcire se adaugă 0,3 g creatină monohidrică și se dizolvă. Soluția poate fi păstrată la frigider ($+4^{\circ}\text{C}$) cca 1 lună. Din acest reactiv se adaugă culturii de cercetat 5 ml, reacția pozitivă fiind dată de colorarea în roșu trandafirii a amestecului, după agitare viguroasă și apoi lăsare în repaus. Colorarea începe de la suprafață și în decurs de cca 4 ore cuprinde tot amestecul.

— Reactivul Leifson se prepară din 1,0 g sulfat de cupru dizolvat în 40 ml amoniac concentrat (min. 25%) la care se adaugă 690 ml soluție de hidroxid de potasiu 10%. Din acest reactiv se adaugă 5 ml fiecărui tub cu cultura de cercetat. Reacția pozitivă constă în colorarea în roșu a amestecului.

— Reactivul Barrit se prepară dizolvând 5 g alfa naftol în 100 ml ethanol. Reacția se execută adăugând culturii proaspete de 1—2 zile 3 ml de reactiv și 1 ml KOH 40%. Reacția pozitivă este dată de colorarea în roșu.

Testul catalazei se folosește pentru punerea în evidență a existenței catalazei în culturile pe medii solide sau lichide. Se folosește apa oxigenată 3%. În cazul culturilor pe medii solide se pune o picătură de apă oxigenată pe lama de microscop și se adaugă cu o ansă bacteriologică o cantitate de cultură. Reacția pozitivă este dată de apariția unor bule de gaz (oxigen) care se degajă cu o intensitate variabilă, în funcție de cantitatea de catalază existentă în cultură.

În cazul culturilor pe medii lichide, se amestecă 5 ml din cultura în bulion triptic de 24 de ore cu 3 ml soluție de apă oxigenată. Reacția pozitivă este dată de producerea unei efervescențe cu degajare de bule de oxigen, care durează 1—2 minute. Reacția devine mai evidentă dacă, înaintea soluției de apă oxigenată, se adaugă la cultură o cantitate egală dintr-o soluție 10% de săpun.

Testul oxidazei se efectuează depunând câteva picături dintr-un reactiv constituit din soluție apoasă 10% de clorhidrat de tetrametil parafenilen diamină sau oxalat de dimetil parafenilen diamină, preparat, ex tempore pe un fragment de hîrtie de filtru Whatman nr. 1, avînd dimensiunile de 6×6 cm. Cu o ansă se ia din cultura de cercetat și se depune pe hîrtie ca la executarea unui frotiu.

Reacția pozitivă este dată de apariția unei colorații roșii-brune spre negru în dreptul culturii depuse într-un interval de 5—10 secunde, iar reacția negativă, de lipsa oricărei modificări a hîrtiei îmbibate.

Reacția se poate executa și în plăci Petri cu culturi, depunînd reactivul direct pe colonii. În cazul unor colonii oxidazo-pozitive, acestea devin succesiv roșii, brune, apoi negre.

Testul decarboxilazei — Falkov folosește un mediu de bază avînd următoarea compoziție:

— peptonă Bacto	5,0 g
— extract de drojdie de bere	3,0 g

- glucoză 1,0 g
 - bromcrezol purpur (sol. alcoolică 1,6%) 1,0 ml
 - apă distilată 1 000,0 ml
- pH-ul = 6,7—6,8

Mediul se împarte în 4 părți egale, dintre care la 3 se adaugă aminoacizii: L-lizina dihidroclorică, L-arginina monohidroclorică, L-ornitina dihidroclorică, toate în concentrație de 1%, iar ultima servește drept martor. Se reajustează pH-ul mediilor cărora li s-au adăugat aminoacizi, se repartizează câte 3—4 ml în tuburi de 100/10 sau 120/12 mm și se sterilizează 10 minute la 121°C. Dacă aminoacizii sînt în formă DL se folosesc în concentrație dublă — 2%.

Însămînțarea se face cu ansa, dintr-o cultură tinăra pe agar înclinat și apoi se adaugă un strat de oleu de parafină steril, gros de 4—5 mm, inclusiv în tuburile martor. Incubarea la 37°C timp de 4 zile este urmată de interpretare.

Reacția pozitivă este dată de alcalinizarea mediului (datorită decarboxilării) cu schimbarea culorii sistemului de indicatori, de la galben la violet sau roșu-violet. Majoritatea reacțiilor pozitive apar în primele două zile. Reacția negativă este indicată de o culoare galbenă (pH-ul acid al mediului).

Reacții care urmăresc punerea în evidență a folosirii ca sursă de hrană a unor substraturi conținute în mediu

Testul cultivării pe medii cu citrat de sodiu. Mediul conținând citrat de sodiu este favorabil dezvoltării numai anumitor bacterii (de exemplu *Enterobacter*, *Citrobacter*, *S. gallinarum*), în timp ce altele (de exemplu *Shigella*, *Escherichia coli*, *S. pullorum*) nu pot folosi citratul ca sursă energetică. Cele care se dezvoltă, prin alcalinizare determină și virarea culorii verzui a mediului, către albastru intens.

Teste speciale folosite pentru identificarea micobacteriilor

În practica laboratoarelor de specialitate au intrat în ultimii ani o serie de reacții pentru testarea capacității metabolice a micobacteriilor, reacții care au devenit indispensabile pentru încadrarea de specie. Cele mai importante dintre acestea sînt testul niacinei, catalazei, nitrat-reductazei, hidroliza Tween 80, determinarea spectrului amidazic. Pentru cercetări de profunzime privind stabilirea caracterelor diferitelor tulpini se poate face și stabilirea capacității zaharolitice.

Testul niacinei. Tuburilor de cultură proaspătă pe mediul Löwenstein-Jensen li se adaugă câte 1 ml apă distilată. Se pun apoi la autoclavul cu capacul deschis timp de 20 minute, după care se scot și se lasă să se răcească. Din lichidul de extracție se pune câte o picătură pe o placă de plastic sau preferabil porțelan, prevăzută cu godeuri. Se adaugă 1 picătură dintr-o soluție 4% de anilină în alcool etilic 90°, preparată ex tempore și o picătură de bromură de cianogen. Este indicat ca placa să se pună într-o nișă cu evacuare, pentru a evita inhalarea vaporilor toxici. Reacția pozitivă constă în apariția unei colorații galben-canar

(sușele umane), iar cea negativă în păstrarea culorii inițiale (sușele bovine și aviare).

După o altă tehnică, se adaugă tubului cu cultura studiată 1 ml ser fiziologic steril, se lasă 20 minute în poziție înclinată, în așa fel încât cultura să fie total acoperită. Se scot apoi 0,5 ml cu o pipetă și se pun într-un tub de reacție. Se adaugă 0,5 ml din soluția de anilină 4% și 0,5 ml dintr-o soluție de 10% de bromură de cianogen (BrCN). Reacția pozitivă este indicată de colorația galbenă.

Acest test se poate efectua și după o a treia metodă. În acest scop, se iau două anse din cultura de cercetat, se pun în eprubete conținând 1 ml de apă distilată, se fierb timp de 1/2—1 oră, se adaugă 1 ml dintr-o soluție 1% de KCN și 1 ml dintr-o soluție 5% de cloramină T, preparată ex tempore. Reacția pozitivă este dată de aceeași colorare în galben a amestecului.

Întotdeauna, este necesar să se efectueze și o probă martor folosindu-se o cultură de *M. tuberculosis* tulpina H₃₇Rv pentru comparație (martor pozitiv).

Proba catalazei se efectuează prin punerea în contact pe lamă, a unei anse cu cultură de micobacterii, cu o picătură de apă oxigenată soluție 30% (din soluția de apă oxigenată de 30 de volume, existentă în comerț se ia o parte, la care se adaugă 3 părți de apă).

Interpretarea reacției se face prin aprecierea cantității de gaze degajată, în sensul că, cu cât există o cantitate mai mare de catalază în cultură, cu atât cantitatea de oxigen degajată este mai mare. Pozitivitatea acestei reacții este legată de specie și tulpină, fiind slabă la tipul uman, inconstantă la tipul bovin și intensă la tipul aviar și alte micobacterii atipice.

Proba nitrat-reductazei. În tuburi de reacție corespunzătoare numeric tulpinilor cercetate, se pun întâi 0,5 ml dintr-o soluție de NaNO₃ (85 mg NaNO₃ crist. în 100 ml apă distilată avînd pH-ul 7).

Se adaugă apoi 0,5 ml dintr-o suspensie micobacteriană omogenă, conținând 10 mg germeni pe ml, în soluție tampon fosfat la pH 7,2.

Tuburile se pun la incubare la 37°C timp de 24 de ore. Se adaugă apoi 0,5 ml dintr-o soluție de sulfanilamidă (1 g de sulfanilamidă în 75 ml apă distilată + 25 ml HCl) și 0,5 ml dintr-o soluție 0,02% de naftiletildiamină în apă distilată. Se lasă 10 minute, după care se face citirea. Reacția pozitivă este dată de colorarea în verde-albăstrui a amestecului. Nuanța este variabilă în funcție de cantitatea de nitriți care rezultă din reducerea nitraților. Reacția este pozitivă în cazul *M. tuberculosis*, negativă la *M. bovis* și variabilă la celelalte micobacterii.

Hidroliza Tween-80. Se folosește o soluție substrat formată din:

— soluție tampon-fosfat M/15 (pH 7)	100,0 ml
— Tween—80	0,5 ml
— soluție apoasă de roșu neutru 0,1%	2,0 ml

Se repartizează în eprubete sterile, în cantitate de 2 ml, se autoclavează, obținându-se o soluție de culoare galbenă-carmin. Soluția se poate păstra la +4°C cca 2 săptămîni.

În tuburile conținând acest substrat se însămîntează tulpinile de cercetat (cite o ansă de cultură pentru fiecare tub) fără a se omogeniza în mediu. Se incubează timp de 5 zile la 37°C, cînd se face o citire în-

termediară, iar după alte 5 zile cea definitivă. În caz pozitiv, culoarea mediului virează de la galben-carmin la roz sau chiar roșu. Tuburile nu trebuie agitate. O reacție pozitivă este concludentă dacă colorația roză sau roșie interesează numai soluția-substrat, nu și cultura.

Ca martori, se folosesc un tub cu soluție-substrat neînsămînțată (control negativ) și un tub însămînțat cu *M. kansasii* (control pozitiv).

Tipul bovin și aviar dau o reacție negativă la ambele citiri, în timp ce alte micobacterii (*kansasii*, *flavescens*, *gastri*, *terrae*, *smegmatis*, *phlei*, *marinum*) dau reacții pozitive. Tipul uman dă o reacție discretă.

Determinarea spectrului amidazic al micobacteriilor. Se dizolvă întâi amidele de cercetat în apă distilată sterilă, încălzindu-se la 60°C (la baie de apă). În mod obișnuit se folosește o serie de 10 amide (mica serie a lui Bönicke) în următoarele concentrații exprimate în mg/100 ml:

1 — acetamidă	9,68
2 — benzamidă	19,48
3 — uree	9,84
4 — izonicotinamida	20,0
5 — pirazinamida	20,16
6 — nicotinamida	20,0
7 — salicinamida	22,46
8 — allantoina	26,0
9 — succinamida	19,0
10 — malonamida	16,72

Din soluțiile astfel preparate, se repartizează câte 0,5 ml din fiecare, în atâtea tuburi de reacție câte tulpini se cercetează.

În soluție tampon la pH 7,2 se realizează suspensii bacteriene omogene din tulpinile de cercetat, în concentrație de 10 mg bacterii la 1 ml soluție. Pentru o mai bună omogenizare este preferabil să se recurgă la tuburi de centrifugă sterile, a căror tară s-a făcut pentru fiecare în parte, la balanță analitică (cu 2 zecimale), în care se repartizează câte 3—4 anse de masă bacteriană raclată de pe suprafața mediului Löwenstein-Jensen (culturi proaspete). Apoi eprubetele se recîntăresc, stabilindu-se exact greutatea germenilor. Cu baghete de sticlă de cca 5 mm diametru, sterile, se omogenizează apoi cultura pe pereții tubului, pînă se obține o pastă cît mai omogenă. Se adaugă o cantitate redusă de soluție fiziologică și se continuă omogenizarea, realizîndu-se o suspensie uniformă. Aceasta se diluează pînă la un volum de 4—5 ml și se pune centrifugării timp de 10 minute, la 3000 t/minut.

Se varsă lichidul supernatant într-un vas (care apoi se va steriliza), se omogenizează din nou cu o baghetă și se adaugă soluție fiziologică pînă la volumul inițial. Se recentrifughează, se varsă lichidul, se omogenizează și se adaugă (eventual fracționat) o cantitate de soluție tampon, variabilă în funcție de cantitatea de masă bacteriană cîntărită inițial, în așa fel încît concentrația realizată să fie de 10 mg/ml (de exemplu dacă cultura netă a cîntărit 65 mg va fi suspensionată în 6,5 ml soluție tampon fosfat).

Peste soluțiile de amide, repartizate în prealabil în eprubete, se adaugă câte 0,5 ml suspensie bacteriană pentru fiecare tub cu amidă și se omogenizează amestecul, se pune la incubare la 37°C timp de 22 de ore, după care se efectuează reacția de testare propriu-zisă.

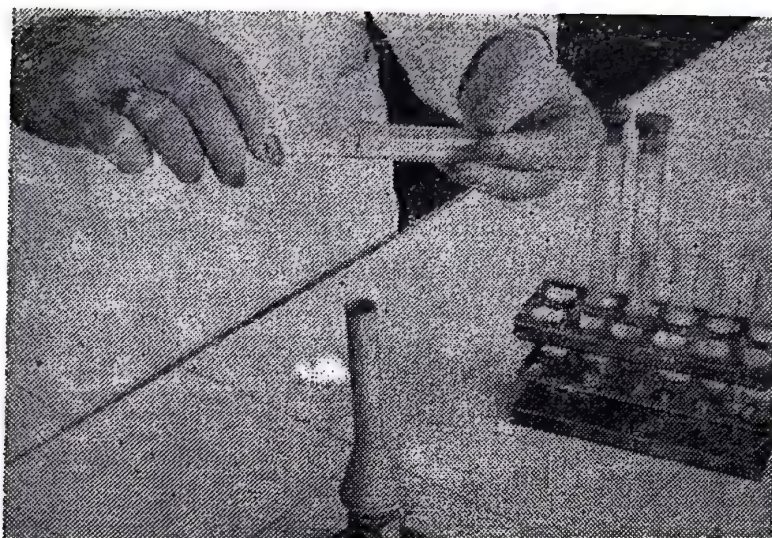


Fig. 26 — Omogenizarea culturii cu ajutorul baghetei de sticlă în eprubete de sticlă

În acest scop, se adaugă în fiecare tub câte 1 ml reactiv fenol, o picătură dintr-o soluție de sulfat de mangan și 0,5 ml apă de Javelle, pregătite după indicațiile care urmează. Amestecul are o culoare galbenă-pai. Totul se pune la etuvă la 80°C timp de 15 minute, după care se lasă să se răcească și se face citirea. Reacția pozitivă constă în apariția unei colorații de nuanțe diferite, de la galben-verzui la albastru-închis, în funcție de cantitatea de enzime conținute în cultură.

M. tuberculosis are spectrul amidazic 3,5,6 (uree, nicotinamida, pyrazinamida), tipul aviar spectrul 5,6 (nicotinamida, pyrazinamida), iar tipul bovin fermentează numai rareori ureea (3). La celelalte micobacterii este variabil cu specia.

Reactivul fenol se prepară punând 250 g fenol cristalin (anhidru) într-un pahar Berzelius de 500 ml care, la rîndul lui, se pune într-o baie marină la maximum 40°C. Separat se dizolvă 108 g NaOH cristalin în cca 500 ml apă distilată rece. Prin dizolvare încălzindu-se, trebuie răcit apoi la apă de robinet. Cînd ambele substanțe s-au dizolvat, se toarnă hidroxid peste fenolul solubilizat și se completează la 1000 ml cu apă distilată. Soluția trebuie să aibă o culoare galbenă-pai și se poate păstra în sticle brune, etanșe, la frigider, cca 1 lună.

Soluția de sulfat de mangan se prepară dizolvînd 66,92 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ în 100 ml apă distilată; se păstrează la frigider, în sticle brune.

Apă de Javelle (hipoclorit de sodiu 25%) se prepară conform rețetei obișnuite, dar se diluează pentru lucru în proporție de 1/10 (1 parte apă de Javelle brută + 9 părți de apă).

Determinarea sensibilității germenilor față de substanțe antibiotice și chimioterapice

Determinarea sensibilității față de antibiotice (antibiograma)

Această operațiune are o deosebită importanță practică, ea furnizând date foarte utile pentru aplicarea corectă a măsurilor terapeuțico-profilactice. Într-o serie de boli bacteriene (holera aviară, colibaciloza vițelilor, mamitele stafilococice, infecțiile salmonelice, listeriene etc.), administrarea antibioticelor, mai ales în tratamentele de masă, este indicat să se facă numai după ce s-a stabilit spectrul de sensibilitate a agenților cauzali față de acestea. În special în etapa actuală, când tulpinile rezistente față de antibiotice, chiar cu spectru larg, sînt din ce în ce mai frecvent semnalate, este imperios necesar, atît din punct de vedere economic cît și din considerente epizootologice, să se acționeze cu substanțe eficiente.

Mecanismul antibiogramei se bazează pe inhibarea dezvoltării unei culturi microbiene puse în contact cu doze variate de antibiotice pe medii de cultură adecvate.

Testarea sensibilității față de antibiotice se poate face prin două metode mai importante: metode difuzimetrice; metode folosind diluții seriate.

Metodele difuzimetrice se bazează pe însușirea soluțiilor de antibiotice de a difuza în mediul de cultură pe diferite distanțe de la punctul în care sînt puse.

Ca medii nutritive se folosesc geloza simplă, geloza cu ser (pentru speciile serofile) sau medii speciale (pentru germenii care se cultivă numai pe asemenea medii).

Ca metode de lucru, există descrise o serie de tehnici: tehnica rondelilor de hîrtie de filtru îmbibate cu diferite antibiotice, tehnica benzilor de hîrtie de filtru, tehnica cilindrilor sau tuburilor de sticlă cu agar, tehnica agarului cu godeuri, tehnica jgheaburilor în agar, tehnica difuziunii verticale, tehnica microcomprimatelor.

Deoarece la noi în țară, la ora actuală cel mai larg folosită este tehnica microcomprimatelor standardizate, va fi descrisă în amănunt numai aceasta.

Pe mediile de cultură amintite, turnate în plăci Petri și zvîntate prin ținerea la termostat cu capacul semideschis timp de 20—30 minute, se face însămînțarea culturii microbiene de cercetat. În acest scop, din

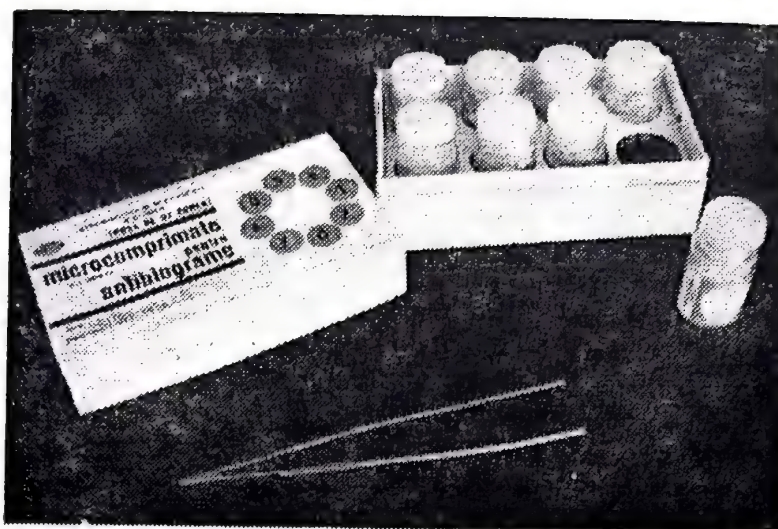


Fig. 27 — Set de microcomprimate cu antibiotice pentru antibiogramă

culturi de 18—24 de ore în bulion, se realizează mai întâi o diluție de 10^{-3} în ser fiziologic steril (în cazul streptococilor), de 1/200 (în cazul stafilococilor). Diluarea se realizează pentru a obține colonii foarte dese, dar nu confluențe. Din suspensia microbiană rezultată se ia cu o pipetă Pasteur o cantitate de 1—1,2 ml care se depune pe suprafața mediului, în apropierea flăcării. Prin înclinări repetate se dispersează apoi suspensia pe toată suprafața, după care excesul de cultură se scoate cu ajutorul aceleiași pipete și se aruncă în vasul cu dezinfectant. Însămînțarea se mai poate face și cu ajutorul unui tampon sterilizat, imbibat cu suspensia bacteriană, cu care se umectează apoi, în mod uniform, întreaga suprafață a mediului. Mediul astfel însămînțat se pune din nou la termostat cu capacul plăcii semideschis, pentru zvîntare, timp de 20—30 minute. Apoi, cu ajutorul unei pensete flambate în prealabil, se repartizează microcomprimatele, avîndu-se grija ca acestea să fie la

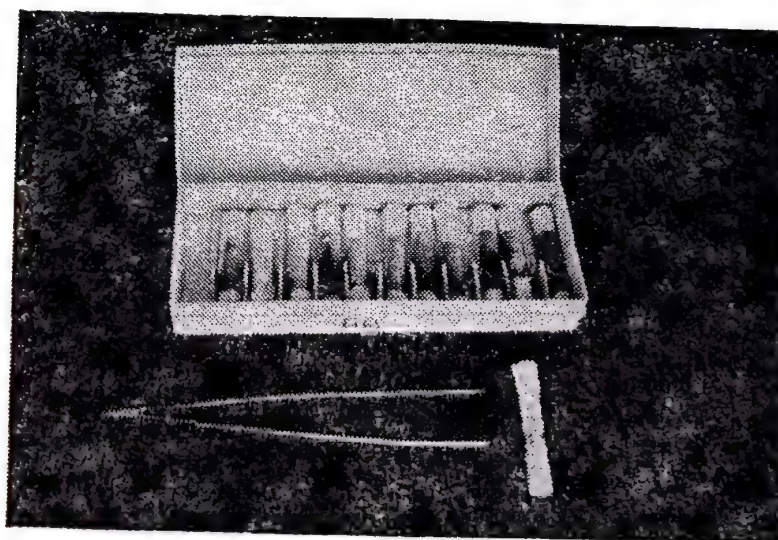


Fig. 28 — Set de rondole cu antibiotice pentru antibiogramă

cca 15 mm de periferia mediului și la cca 30 mm unul de altul și ca simbolul imprimat pe microcomprimate, care indică antibioticul corespunzător să fie deasupra (de exemplu A = ampicilină, C = cloramfenicol, E = eritromicină, K = kanamicină, O = oxacilina, P = penicilină, G, S = streptomycină, T = tetraciclină, L = lincomicină, No = novobiocină, R = rifampicină, Ne = neomicină, Po = polimixina, B = bacitracină etc.). Pentru o amplasare corectă se pot folosi șabloane care se așază sub placa cu mediu înainte de a începe operațiunea. Plăcile se pun apoi la termostat, rezultatele interpretându-se după 18—24 de ore de incubare. Citirea constă în aprecierea mărimii zonelor de inhibiție indusă de antibiotic, zone în care coloniile microbiene lipsesc. Diametrul acestora este direct proporțional cu sensibilitatea germenului respectiv, în sensul că cu cât substanța antibiotică este mai activă, zona de inhibare a dezvoltării microbiene este mai extinsă.

Metodele cu diluții seriate folosesc soluții de antibiotic în apă bidistilată neutră sau în soluții tamponate la pH 7. Majoritatea antibioticelor se dizolvă cu ușurință. Aureomicina și terramicina nu sînt însă

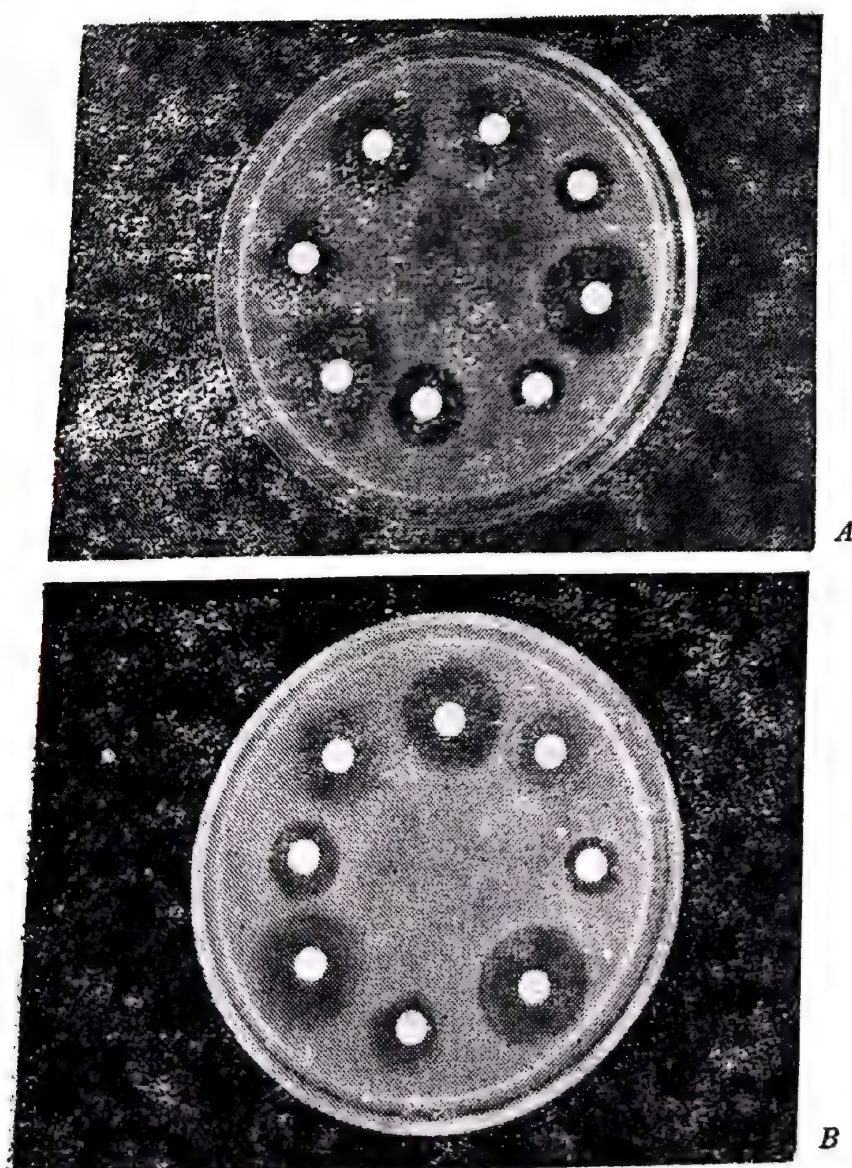


Fig. 29 — Antibiotograma (A, B — grade diferite de sensibilitate față de antibiotice)

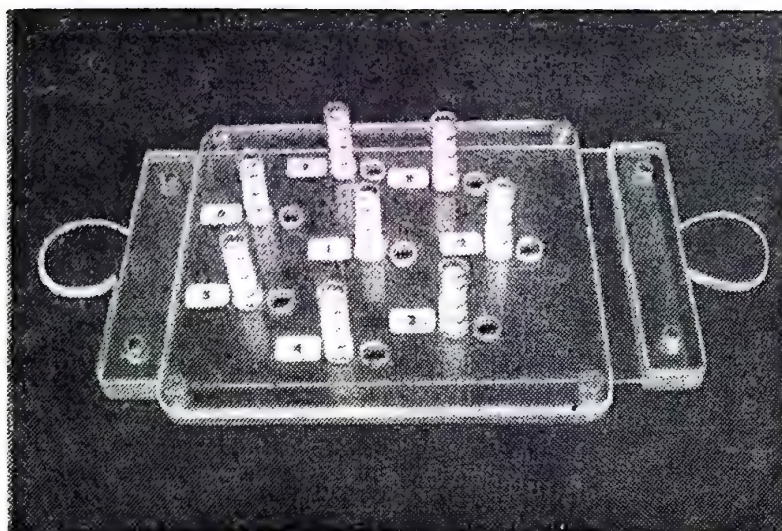


Fig. 30 — Dispozitiv original de distribuire automată a microcomprimatelor de antibiotice în plăcile de agar

solubile decât în apă acidulată (aureomicina se dizolvă într-un amestec de 20 picături dintr-o soluție 1% acid sulfuric p.a. la 10 ml apă, având un pH final de 4,2—4,5 iar terramicina în soluție de acid clorhidric la pH 6). Eritromicina se dizolvă în alcool metilic (10 ml metanol pentru 0,025 g eritromicină, se completează până la 100 ml cu apă distilată tamponată la pH 8).

Conservabilitatea acestor soluții nu este de lungă durată (penicilina 7 zile la $+4^{\circ}\text{C}$, streptomicina 10—14 zile, aureomicina 12 zile).

Din soluțiile de antibiotic, se fac diluții succesive în bulion steril, în așa fel încât să se obțină în fiecare tub o concentrație precis cunoscută pe ml. Inițial acestea se fac din 10 în 10, urmînd ca, în cazul că este necesară o determinare mai precisă, să se facă și diluții intermediare. De exemplu, în cazul penicilinei se folosesc diluții de 100; 10; 1; 0,1; 0,01 și 0,001 U.I./ml, streptomicina 100; 10; 1; 0,1; 0,01 și 0,001 micrograme/ml.

În fiecare diluție, inclusiv în tubul martor, fără antibiotic, se însămînțează o cantitate constantă din cultura în bulion de 24 de ore din tulpina de cercetat (în mod obișnuit se pun în fiecare tub 1—2 picături din diluția 1/1000; se pot folosi și culturi tinere de 3—4 ore, nediluate). Se incubează tuburile însămînțate timp de 18—24 de ore la 37°C , după care se face interpretarea. Tubul martor trebuie să conțină o cultură corespunzătoare tipului cultural al speciei.

În cazul germenilor sensibili, în primele tuburi ale seriei, în care cantitatea de antibiotice este mare, mediul rămîne nemodificat, pentru ca în ultimele aspectul să fie apropiat sau identic cu cel din tubul martor.

Titru bacteriostatic este indicat de cantitatea minimă de antibiotic care a fost capabilă să producă o inhibare totală a dezvoltării.

Indiferent de metoda întrebuintată, o determinare de precizie necesită compararea cu sensibilitatea unor tulpini cu sensibilitate cunoscută și de asemenea, cu antibiotice etalon, avîndu-se în vedere diferențele care pot exista între produsele aparținînd unor firme diferite. Dintre tulpinile microbiene mai frecvent folosite în acest scop, pot fi amintite

tulpina de stafilococ auriu Oxford 12, tulpina de *Bacillus subtilis* Marburg, tulpina de *E. coli* Bruxelles.

Dozarea antibioticelor din sînge și umori se poate realiza fie prin metoda difuzimetrică, fie prin diluții seriate. Metoda diluțiilor este preferată deoarece rezultatele cantitative oferite sînt mai precise. În acest scop, se recoltează aseptice sînge și, după exprimarea serului, se păstrează la frigider pînă în momentul dozării (nu mai mult de 24 de ore). Pentru neutralizarea activității antimicrobiene native a serului se recurge la o prealabilă inactivare la 56°C (încălzirea este însă contraindicată în cazul penicilinei, care este termosensibilă, procedîndu-se la inactivarea prin metode chimice).

În 16 tuburi de reacție sterile se repartizează cîte 1 ml bulion (de preferință operațiunea se face cu 24 de ore înainte pentru a permite și controlul sterilității mediului prin incubare la termostat).

În primele 8 tuburi se fac diluții succesive din antibioticul etalon, fiecare diluție fiind cuprinsă într-un volum de 1 ml (în cazul penicilinei de exemplu, se realizează 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015 și 0,007 U.I. pe ml). În celelalte 8 tuburi se fac diluții succesive din serul de examinat: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 — ambele serii de tuburi se însămîntează cu cîte o picătură din cultura de cercetat de 18—24 de ore, diluată 1/1000 și se pun la termostat timp de 24 de ore.

În interpretarea rezultatelor se notează cantitatea minimă de antibiotic și diluția maximă de ser, care au inhibat total dezvoltarea tulpinii sensibile. Diluția maximă inhibată de ser va conține o cantitate de antibiotic egală cu cantitatea minimă inhibantă. Cantitatea de antibiotic din ser, pe unitatea de volum, se obține înmulțind cantitatea minimă de antibiotic întrebuintată cu diluția maximă inhibantă de ser. De exemplu, dacă în seria cu diluțiile de penicilină, ultimul tub în care s-a produs inhibiția corespunde unei cantități de 0,06 U.I. iar în seria diluțiilor de ser ultimul tub în care cultura este inhibată de 1/32, cantitatea de penicilină din ser va fi egală cu $0,06 \times 32 = 1,92$ U.I./ml.

Testarea rapidă a sensibilității față de antibiotice prin metoda microcoloniilor a fost elaborată de MAHONY și CHADWICK și permite obținerea rezultatelor în decurs de 4 ore. Se practică pe plăci cu agar și folosește direct materialul patologic suspect. Suspensiile de antibiotice se fac la o concentrație de 1 mg/ml în apă distilată sterilă. Ele se adaugă agarului proaspăt topit la 50°C și repartizat în strat subțire în plăci. Concentrația antibioticului în agar este:

— penicilina	0,1 și 1,0 unit./ml
— eritromicina	0,4 și 0,8 micrograme/ml
— novobiocina	2 și 36 micrograme/ml
— tetraciclina	5 și 16 micrograme/ml
— streptomicina	5 și 15 micrograme/ml
— cloromicetina	8 și 16 micrograme/ml
— kanamicina	6 și 16 micrograme/ml
— neomicina	6 și 16 micrograme/ml
— colymicina	3 și 10 micrograme/ml
— polimixina B	20 unit./ml
— framycetina	20 micrograme/ml
— lincomicina	1,6 micrograme/ml
— oxacilina	1,0 microgram/ml

- methicilina 5 micrograme/ml
- ampicilina 6 și 20 micrograme/ml

Metoda se poate practica în cazul fecalelor, urinei, sîngelui sau altor materiale patologice. Fecalele se suspendă mai întîi în soluție fiziologică sterilă, în proporție de 1/4. Urina și sîngele se diluează în proporție de 1/10 pînă la 1/100. Din aceste diluții, se fac însămînțările pe plăcile cu mediu conținînd antibiotice și pe plăcile martor cu mediu fără antibiotice și se incubează 4 ore la 37°C. Suprafața agarului este apoi examinată la microscopul obișnuit. Mai întîi se examinează plăcile martor. Interpretarea se face astfel:

- creșterea pe plăcile martor și pe cele conținînd antibiotice este egală, ceea ce denotă rezistență totală;
- creșterea pe plăcile martor, cuplată cu lipsa oricărei dezvoltări pe plăcile însămînțate cu material patologic, denotă sensibilitate totală;
- creșterea unor colonii mai puțin numeroase pe plăcile conținînd antibiotice față de plăcile martor, denotă sensibilitate moderată, interpretabilă variabil, după intensitatea dezvoltării.

Determinarea sensibilității față de antibiotice și chimioterapice a micobacteriilor. În operațiunile de testare a acestei sensibilități, Uniunea Internațională contra tuberculozei a stabilit atît jaloanele principale cît și metodologia de lucru, în vederea uniformizării acestora. În acest sens axarea pe mediul Löwenstein—Jensen a devenit necesară pentru a asigura rezultate comparabile pe plan internațional. Au fost de asemenea stabilite concentrații standardizate de tuberculostatice, care se înglobează în mediile de cultură.

În acest scop, din culturi proaspete de micobacterii pe mediul Löwenstein—Jensen se ia o ansă bacteriologică avînd diametrul de 3 mm (diametru interior) încărcată și se pune într-un balon rotund sterilizat de 150 ml și care conține 4 perle de sticlă. Se lasă materialul de pe ansă în balon și se flambează ansa sub protecția unui clopot de sticlă montat la becul de gaz (pentru a evita eventuala împrăștiere a germenilor în cursul flambării). Flacoanele se numerează cu indicativele tulpinilor de cercetat. Se omogenizează temeinic cultura din baloane cu ajutorul perlelor de sticlă, prin mișcări de rotație, pînă se obține o pastă uniformă pe pereții vaselor (5—10 minute). Se adaugă apoi 1—2 ml de apă distilată sterilă și se omogenizează din nou, pînă se realizează o suspensie omogenă. Se pregătesc apoi serii de cîte 3 balonașe Erlenmayer sterile pentru fiecare tulpină, corespunzătoare celor 3 diluții de germeni cu care se lucrează și se pun cîte 2 ml apă distilată sterilă în primul balon, 1,8 ml în al doilea și 1,8 ml în al treilea. Se iau din balonul cu perle conținînd suspensia unică bacteriană primară, cu ajutorul unei pipete sterile, 0,2 ml și se pun în primul balonaș cu apă distilată. Suspensia obținută se ajustează apoi la o turbiditate corespunzătoare unui conținut de 10 000 000 germeni pe ml prin comparație cu o scară Brown.

Din această diluție se trec apoi în balonașul următor 0,2 ml obținîndu-se o suspensie de 1 000 000 germeni pe ml. După omogenizare se iau alți 0,2 ml și se trec în ultimul balon, obținîndu-se astfel diluția de 100 000 germeni pe ml.

Diluția finală se lasă în repaus pînă a doua zi cînd se fac însămînțările. Acestea se efectuează luîndu-se o ansă bacteriologică din suspensia respectivă, ceea ce corespunde aproximativ cu 10 000 de germeni.

Însămînțarea se face pe tuburi cu mediu Löwenstein—Jensen avînd înglobate diferitele tuberculostatice, față de care se face testarea.

Concentrațiile principalelor tuberculostatice cu care se lucrează în mod curent sînt următoarele:

— streptomycină	4 și respectiv 10 gamma/ml
— P A S	1 și respectiv 10 gamma/ml
— Nizotin	20 și respectiv 30 gamma/ml
— HIN	0,2 și respectiv 1 gamma/ml
— Etambutol	3 și respectiv 5 gamma/ml
— Rifampicină	20 și respectiv 40 gamma/ml
— Viomicină	20 și respectiv 30 gamma/ml

Tuburile cu mediu se notează înainte de însămînțare cu indicativul tulpinii, tuberculostaticul și concentrația acestuia din mediu.

Suspensia bacteriană de însămînțat se dispersează cît mai omogen pe suprafața mediului, inoculîndu-se din fiecare probă cîte două tuburi.

Din aceeași diluție se însămînțează de asemenea, ca martor, cîte două tuburi pe mediu lipsit de tuberculostatice. Tuburile se astupă cu dopuri de vată și tifon, care se parafinează, sau cu dopuri de cauciuc prevăzute cu orificii de aerisire speciale (un fir de ață trecut prin dop). Se pun apoi la incubare timp de 21 de zile, după care se face interpretarea rezultatelor în funcție de modul de dezvoltare a coloniilor pe mediile cu diferite concentrații de tuberculostatic și prin comparație cu tubul martor. Rezultatele se notează astfel:

- +++ creștere confluentă, denotînd rezistența totală față de tuberculostaticul respectiv;
- ++ colonii izolate, numeroase, ce nu pot fi numărate, denotînd o rezistență moderată;
- + colonii ce pot fi numărate, fiind în număr de 20—100 pe întreaga suprafață a mediului, denotînd o rezistență redusă (existența unui număr de sub 20 colonii se specifică de asemenea, indicînd o rezistență și mai redusă);
- 0 lipsa dezvoltării, denotînd sensibilitatea totală a tulpinii.

Determinarea acțiunii antibacteriene a substanțelor antiseptice și dezinfectante

Valoarea antibacteriană a unei substanțe se apreciază prin comparație cu o altă substanță, cel mai frecvent folosindu-se fenolul. În acest scop se determină indicele sau coeficientul fenolic, exprimînd de cîte ori o substanță este mai activă sau mai slabă decît fenolul.

Pentru a determina indicele fenolic se fac întîi diluții seriate din soluția antiseptică de cercetat. Se amestecă apoi cîte 1 ml din fiecare diluție cu cîte 1 ml din cultura bacteriană în bulion de 24 de ore.

După 5 minute de la începerea efectuării diluțiilor, deci 5 minute de contact între germeni și substanța de cercetat se fac transplantări cu ansa bacteriologică, din fiecare tub din prima serie de tuburi cu bulion.

După alte 5 minute, deci la 10 minute de contact cu substanța de cercetat, se face o nouă însămînțare din fiecare diluție în altă serie de tuburi cu bulion.

Paralel cu substanța de cercetat se procedează la aceleași operațiuni și cu fenolul, transplantările făcându-se la aceleași intervale (5 și 10 minute).

Tuburile însămînțate se pun la incubat și, după 24 de ore, se face citirea. Se notează diluția maximă de fenol și respectiv de substanță de cercetat care inactivează suspensia bacteriană în 10 minute dar nu în 5 minute. Pentru calcularea indicelui fenolic se împart cele două cifre (aceea a diluției active a substanței cercetate la cifra diluției active de fenol). De exemplu, dacă ultima diluție activă la 10 minute dintr-o substanță examinată este 1/10, iar ultima diluție activă de fenol este 1/80, indicele fenolic este dat de formula:

$$\frac{100}{80} = 1,25$$

Determinarea capacității de elaborare a unor toxine bacteriene

Unii germeni bacterieni au capacitatea de a elabora în cursul multiplicării lor *in vitro* sau *in vivo* exotoxine care, inoculate la animale de experiență, determină instalarea unor procese toxice mai mult sau mai puțin grave, în funcție de doză, calea de inoculare, și sensibilitatea animalelor respective. Astfel, unii stafilococi, unele salmonele, *E. coli* și clostridiile (*tetani*, *botulinum*, *welchii*, *septicum* etc.) produc toxine care, de fapt, sînt responsabile de întregul cortegiu de tulburări clinice care survin în cazul toxiinfecțiilor cu acești germeni. Pentru a stabili apartenența etiologică a tulburărilor constatate și, implicit, pentru a identifica cu precizie agentul cauzal, se recurge la o serie de teste de punere în evidență a toxinelor elaborate, fie în produsele patologice, fie în culturile pe medii artificiale, ale bacteriilor respective. Astfel, se folosesc destul de frecvent proba toxicității conținutului intestinal, cuplată cu proba neutralizării toxicității conținutului intestinal, în cazul dizenteriei anaerobe a mieilor, determinarea toxicității filtratelor de cultură în cazul stafilococilor, *E. coli*, bacilului tetanic, *botulinum* etc.

Proba toxicității conținutului gastrointestinal constă în realizarea unei suspensii de conținut intestinal de la nivelul ileonului într-un volum egal de soluție fiziologică. Centrifugarea timp de 1/2 oră la 3000 t/minut este urmată de inocularea supernatantului ca atare și diluat 1/2, 1/4, 1/8 etc. Inocularea se poate face la șoarece, șobolan, cobai, iepure, porumbel, pe diferite căi. Cel mai frecvent se recurge la inocularea pe cale intravenoasă în vena caudală, a șoarecilor. Această cale este cea mai propice și pentru titrarea toxinei și este preferată datorită dozei mici care se inoculează. Cantitatea de 0,5 ml determină fenomene toxico-paralitice, soldate cu moartea animalului în 2—10 minute. Moartea este precedată de fenomene de agitație și tremurături musculare, dispnee gravă, ducînd la asfixie. La necropsie se constată congestia ficatului, pulmonului și masei gastrointestinale.

Inocularea pe cale subcutanată determină fenomene toxice cu evoluție mai lentă, constînd inițial din edem, la locul de inoculare, apoi dispnee, pareze și paralizii musculare, localizate în special la extremități. La necropsie se constată edemațierea regiunilor din zona de inoculare, degenerescență hepatică, congestie renală, hipertrofie splenică, serozități în cavitățile preformate, lichide biliare în intestin.

Șobolanul se poate inocula, cel mai convenabil, pe cale intraperitoneală (0,1—0,5 ml). Moartea este generată de asfixie, precedată de extensia membrilor posterioare, la 1—10 ore de la inoculare.

La cobai, se pot inocula 1—2 ml pe cale subcutanată sau 0,5—1,0 ml pe cale intravenoasă, fenomenele fiind asemănătoare.

La iepure, se inoculează 2—5 ml pe cale intravenoasă.

La porumbel, doza este de 0,1—0,2 ml pe cale intramusculară.

Proba neutralizării toxicității filtratelor de conținut intestinal se face cu scopul de a demonstra că toxina care a determinat fenomenele toxice în urma inoculării suspensiilor de conținut intestinal aparține unui anumit germen, folosindu-se în acest scop seruri neutralizante corespunzătoare.

În cazul dizenteriei anaerobe a mieilor, suspensia de conținut intestinal (supernatantul de centrifugare) se amestecă cu cantități variabile de ser antitoxic *welchii* și după o incubatie de 30 minute la 37°C se inoculează la animale de experiență (preferabil la șoareci). În cazul în care este în cauză toxina corespunzătoare serului respectiv, animalele inoculate nu vor prezenta nici o tulburare.

Testul Dolman. În cazul toxiinfecțiilor alimentare de natură stafilococică, germenii izolați din produsele incriminate se cultivă în atmosferă bogată în bioxid de carbon în agar moale sau pe medii speciale de obținere a toxinei; culturile se încălzesc 15—30 minute la 100°C pentru a distruge fracțiunile toxice termolabile și apoi se filtrează. Inocularea se face în doze de 1—2 ml pe 1 kg de greutate vie, la pisici tinere, în greutate de 400—500 g, pe cale intravenoasă sau intraperitoneală. În cazul că filtratul conține enterotoxina, animalele inoculate vor prezenta o stare de prostrație, ptialism, vomisme, diaree după 15—30 minute de la inoculare și durează câteva ore. Ele se remit, de regulă.

Se poate folosi, în același scop, și inocularea la broască (*Rana esculenta*) în sacul dorsal, în cantitate de 2 ml. Sacrificarea, la 2 ore, permite, în caz pozitiv, observarea unor intense mișcări antiperistaltice, care merg de la pilor spre cardia. Reacția are un ridicat grad de specificitate, în sensul că filtratele obținute din culturile altor specii bacteriene, cu excepția celor din genul *Proteus*, nu produc asemenea modificări de motilitate.

Testarea patogenității germenilor bacterieni pentru animalele de experiență

Inocularea germenilor bacterieni la animalele de experiență reprezintă o metodă importantă atât pentru identificarea cât mai ales pentru stabilirea rolului lor patogen. Nu întotdeauna izolarea unui germen dintr-un proces patologic echivalează cu posibilitatea desemnării lui ca agent responsabil de tulburările constatate. Particularitatea unor germeni de a se găsi în diferite țesuturi, sub formă de biofiți, face ca ei să poată fi izolați frecvent prin însămînțări, ceea ce nu înseamnă neapărat că ei trebuie să fie incriminați ca factori etiologici determinanți. De aceea se recurge la stabilirea patogenității lor față de animalele de experiență.



Fig. 31 — Conținutul șoarecilor în vederea inoculărilor experimentale

După manifestările clinice care se instalează, după durata infecției și localizarea proceselor, după tulburările organice care se constată la necropsie în diferite țesuturi, după modificările histopatologice care se instalează, ca și după transmiterea în serie a germenilor specifici, se poate stabili cu precizie diagnosticul etiologic.

Inocularea se poate face la diferite specii, pe diferite căi și în doze variabile. Dintre animalele de laborator cele mai folosite sînt șoarecii, cobaii, iepurii, șobolanii. În cazuri speciale se pot folosi hamsterul, câinele, pisica, dihorul sau alte specii.

Căile de inoculare și dozele diferă cu specia bacteriană și specia animalelor folosite.

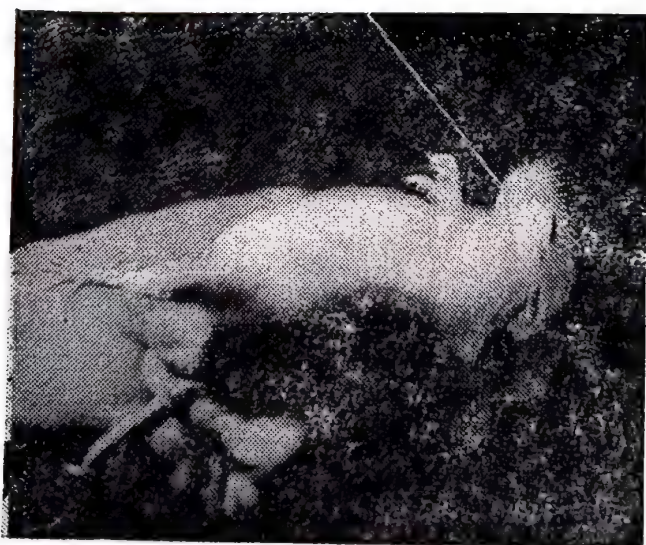


Fig. 32 — Inocularea pe cale orală la șoarece

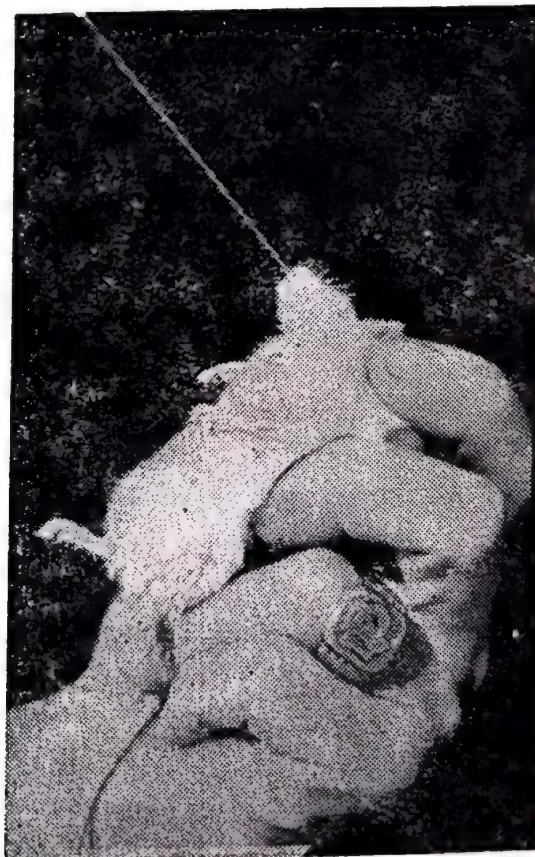


Fig. 33 — Inocularea pe cale intranasală la șoarece



Fig. 34 — Inocularea pe cale subcutanată la șoarece



Fig. 36 — Inocularea pe cale subcutanată în regiunea abdominală la cobai



Fig. 35 — Inocularea subcutanată la cobai, la fața internă a coapsei



Fig. 37 — Inocularea pe cale intramusculară în mușchii cefei la cobai



Fig. 38 — Inocularea pe cale intraperitoneală la șoarece

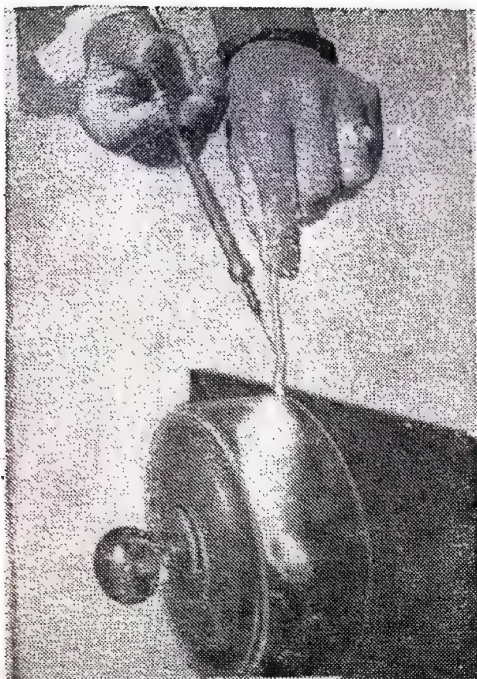


Fig. 40 — Inocularea intravenoasă la șoarece



Fig. 39 — Inocularea intraperitoneală la cobai



Fig. 41 — Inocularea intravenoasă la iepure

Co
mică s
pregăt
ficarea
elecție
zona d
Co
deosek
treaga
rilor,
Co
și se j
coaps
torali
Co
sește
tanței
malul
zează
brusc
musc
riabil
Co
neral
dozel
(cont
în ve
lară
nilor
narco
cătrea
bera
și co

Calea cutanată poate fi epidermică sau intradermică. Calea epidermică se folosește prin simpla depunere a germenilor pe suprafața pielii pregătită în prealabil (prin tundere, radere și dezinfecție) sau prin scarificarea acesteia, în vederea creării unor soluții de continuitate. Zona de elecție este variabilă, cel mai frecvent fiind fața laterală a toracelui, zona dorsală și lombară.

Calea subcutanată este mai severă decât precedenta și asigură, spre deosebire de aceasta, o dozare strictă și — implicit — contactul cu întreaga cantitate de germeni. Zona de elecție este, fie regiunea flancurilor, fie fața internă a coapsei.

Calea intramusculară asigură o resorbție mai rapidă decât precedenta și se practică, în special, în regiunile bogat musculare (mușchii fesieri, m. coapsei, anconai, la animalele mari și cei cervicali, iar la păsări pectoralii). Uneori se folosește inocularea în mușchii cefei.

Calea intraperitoneală asigură o resorbție și mai rapidă și se folosește mai ales la speciile greu de manipulat. Se face la jumătatea distanței dintre torace și pubis, la 0,5—1 cm lateral de linia mediană. Animalul este ținut cu abdomenul în sus de către un ajutor și i se imobilizează membrele și capul. Operatorul perforează cu acul, printr-o mișcare bruscă, pielea aseptizată în prealabil cu tinctură de iod, apoi stratul muscular și peritoneul, injectând suspensia de cercetat, în cantități variabile, în funcție de specie (la iepure pînă la 10 ml).

Calea intravenoasă este cea mai severă, asigurînd o dispersiune generalizată a germenilor în toate țesuturile vascularizate. Ca urmare, și dozele sînt mai reduse. Inocularea se face în vena caudală la șoarece (conțința se face sub un clopot de sticlă, coada rămînînd în afara lui), în vena marginală a urechii la iepure, intracardiac la cobai, în vena axilară la păsări, în vena jugulară sau safenă la speciile mai mari.

Calea intracerebrală se folosește mai ales pentru inocularea germenilor cu tropism pentru sistemul nervos central. Inocularea se face sub narcoză cu eter. După conționarea animalului cu capul pe masă, de către un ajutor, se procedează la toaleta locală a regiunii dintre protuberanța occipitală superioară și protuberanța orbitală externă la iepure și cobai (este recomandabilă o prealabilă trepanație), la jumătatea dis-

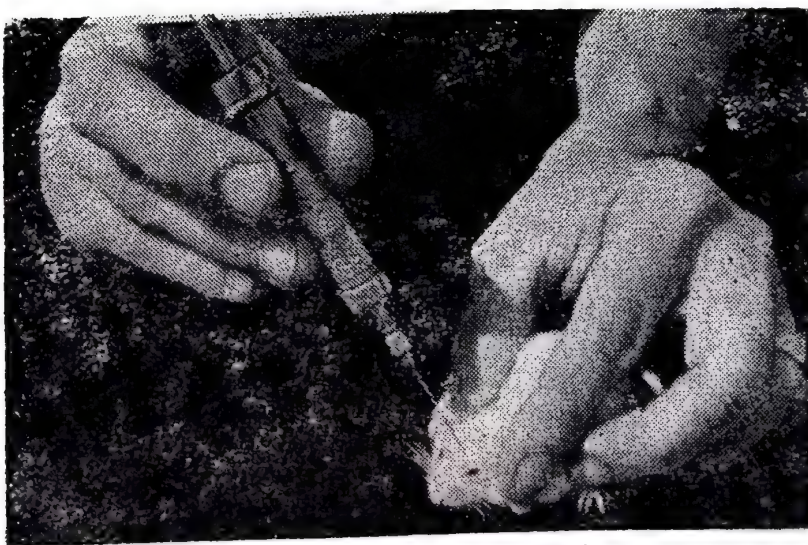


Fig. 42 — Inocularea intracerebrală la șoarece



Fig. 43 — Inocularea intracerebrală la iepure

tanței dintre aceste protuberanțe în cazul șobolanului, la jumătatea distanței dintre ochi și linia mediană a craniului la șoarece. Se face inocularea unei cantități de 0,5—1 ml la iepure, 0,1 ml la șobolan, 0,03 ml la șoarece.

Calea respiratorie presupune depunerea materialului bacterian pe mucoasele căilor respiratorii (nazală sau mucoasa căilor profunde). În cazul cînd se preferă căile profunde, instilația nazală este precedată de narcoza animalului.

În principiu, prin inoculările experimentale se pot face aprecieri calitative, privind patogenitatea unei tulpini, cît și aprecieri cantitative (determinarea gradului de patogenitate prin determinarea DLM sau a DL_{50}).

Gravitatea proceselor patologice care se instalează depinde de o serie de factori.

1 — *Receptivitatea speciei* de animale de experiență folosite, față de specia microbiană. Pentru a evita pe cît posibil erorile care pot rezulta din variabilitatea legată de individ, este recomandabil să se realizeze standardizarea genetică a animalelor folosite în experiențe. Crearea de linii cu un spectru de receptivitate cunoscut și creșterea lor în stare pură reușește în bună măsură să uniformizeze animalele din acest punct de vedere. Astfel, pot fi amintite liniile SW, RAT de șoareci albi, linia C_{57} de șoareci negri, linia Fischer de șobolani etc.

2 — *Vîrsta animalului*. În principiu, cu cît vîrsta este mai fragedă receptivitatea este mai mare. În unele cazuri, la vîrsta adultă, animalele sînt total areceptive, cu toate că la vîrsta tînăra sînt foarte sensibile.

3 — *Sexul animalului* de experiență are importanță mai ales în cazul germenilor cu predilecție pentru sfera genitală (de exemplu, bacilul morvei, brucelele, *Vibrio foetus* etc.).

4 — *Calea de inoculare* are o mare importanță pentru anumite specii microbiene. De exemplu, pentru *B. anthracis*, infecția experimentală se produce cel mai ușor pe cale intracerebrală și intradermică și mai greu pe cale intraperitoneală sau intravenoasă.

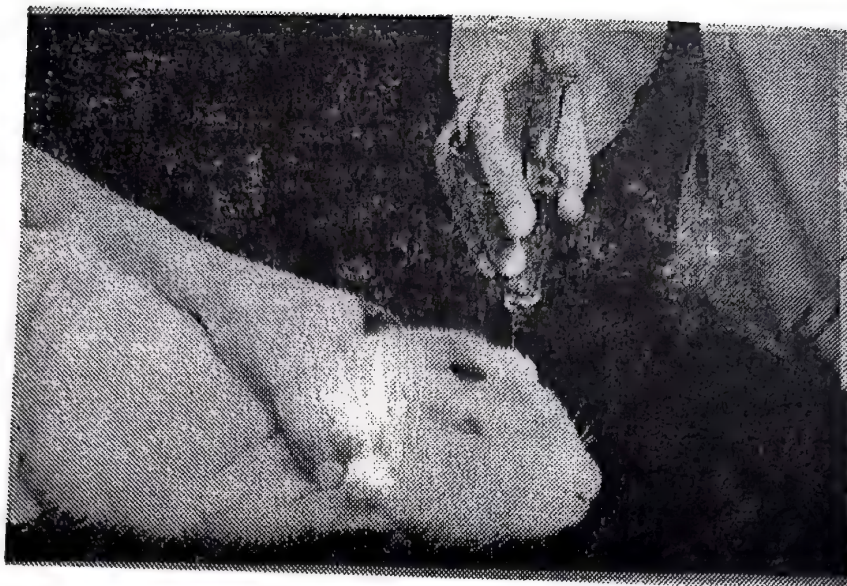


Fig. 43 — Inocularea intracerebrală la iepure

tanței dintre aceste protuberanțe în cazul șobolanului, la jumătatea distanței dintre ochi și linia mediană a craniului la șoarece. Se face inocularea unei cantități de 0,5—1 ml la iepure, 0,1 ml la șobolan, 0,03 ml la șoarece.

Calea respiratorie presupune depunerea materialului bacterian pe mucoasele căilor respiratorii (nazală sau mucoasa căilor profunde). În cazul când se preferă căile profunde, instilația nazală este precedată de narcoza animalului.

În principiu, prin inoculările experimentale se pot face aprecieri calitative, privind patogenitatea unei tulpini, cât și aprecieri cantitative (determinarea gradului de patogenitate prin determinarea DLM sau a DL_{50}).

Gravitatea proceselor patologice care se instalează depinde de o serie de factori.

1 — *Receptivitatea speciei* de animale de experiență folosite, față de specia microbiană. Pentru a evita pe cât posibil erorile care pot rezulta din variabilitatea legată de individ, este recomandabil să se realizeze standardizarea genetică a animalelor folosite în experiențe. Crearea de linii cu un spectru de receptivitate cunoscut și creșterea lor în stare pură reușește în bună măsură să uniformizeze animalele din acest punct de vedere. Astfel, pot fi amintite liniile SW, RAT de șoareci albi, linia C_{57} de șoareci negri, linia Fischer de șobolani etc.

2 — *Vîrsta animalului*. În principiu, cu cât vîrsta este mai fragedă receptivitatea este mai mare. În unele cazuri, la vîrsta adultă, animalele sînt total areceptive, cu toate că la vîrsta tînăra sînt foarte sensibile.

3 — *Sexul animalului* de experiență are importanță mai ales în cazul germenilor cu predilecție pentru sfera genitală (de exemplu, bacilul morvei, brucelele, *Vibrio foetus* etc.).

4 — *Calea de inoculare* are o mare importanță pentru anumite specii microbiene. De exemplu, pentru *B. anthracis*, infecția experimentală se produce cel mai ușor pe cale intracerebrală și intradermică și mai greu pe cale intraperitoneală sau intravenoasă.

5 — *Doza de germeni*. Unii germeni foarte patogeni pot determina infecția și moartea animalelor de experiență în doze foarte mici, în timp ce alții nu reușesc acest lucru în doze foarte mari. De exemplu, *B. anthracis* poate infecta șoarecele în doze de 1—2 germeni pe cale subcutanată, în timp ce *B. cereus*, chiar dacă se inoculează 0,5 ml cultură în bu lion de 24 de ore, nu determină constant moartea acestuia.

Animalele inoculate vor fi marcate (prin vopsire în diferite regiuni ale corpului, în cazul șoarecilor, sau cu ajutorul mărcilor, în cazul animalelor de talie mai mare). De asemenea, se impune ca ele să fie menținute izolat de cele sănătoase, de preferință într-o încăpere special destinată animalelor inoculate. Șoarecii se pun în borcane speciale, pe care se notează natura materialului inoculat, doza, calea și data inoculării.

Manipularea acestor animale se face numai de către personalul instruit în acest scop, în așa fel ca să se evite accidente care se pot produce prin mușcături, zgîrieturi, necropsii etc.

Observația animalelor inoculate se face cu regularitate la intervale variabile, în funcție de rapiditatea cu care se presupune că va evolua infecția, uneori chiar de câteva ori pe zi. Ea constă în inspecție, însoțită sau nu și de alte metode de investigație: termometrie, determinarea unor constante hematologice etc.

În general, într-o infecție experimentală se urmărește:

- durata perioadei de incubație;
- tabloul clinic al bolii (curba termică, prezența unor simptome caracteristice din partea anumitor aparate și sisteme, apariția unor modificări decelabile prin examenul clinic, cum ar fi adenitele satelite locului de inoculare și ulcerele supurante în tuberculoza cobaiului, edemele de la locul de inoculare în infecția cu *B. anthracis* sau tumorile emfizematoase produse de agenții gangrenei gazoase);
- modificări ale constantelor hematologice;
- durata infecției.

În perioada de stare a bolii se pot face unele examene suplimentare (bacteriologice, serologice, alergice).

Necropsia trebuie executată imediat după moarte pentru a evita invadarea țesuturilor de către germenii din tractusul digestiv (*E. coli*, *Cl. septicum*, *Proteus* etc.). În cazuri extreme, mai ales dacă nu sînt necesare însămîntări din singele sau organele acestor animale se poate recurge la păstrarea cadavrelor pentru o perioadă limitată (cîteva ore) la frigider. Necropsia se practică după fixarea animalului în tăvi metalice prevăzute cu dispozitive de fixare a cadavrelor (în cazul cobailor și iepurilor) sau pe plăci de plută, lemn sau azbest (în cazul șoarecilor și șobolanilor).

După fixare, partea ventrală a cadavrului se umectează cu o soluție dezinfectantă și se practică incizia pielii, de-a lungul unei linii verticale submentopubiene și a două linii orizontale între cele două perechi de membre. Se dilacerează țesutul conjunctiv subcutanat, desprinzîndu-se pielea de pe toată partea ventro-laterală, după care se deschide cavitatea abdominală. În acest scop, se face întii o butonieră în stratul muscular de la pubis, care se prelungește pînă la xifoid. Se notează aspectul organelor interne și mai ales al lichidului peritoneal (epansamente seroase, hemoragice, purulente etc.), după care, prin incizii laterale de-a lungul ultimelor coaste, se evidențiază restul organelor abdominale. Prin două incizii interesînd pereții costali laterali, cît mai aproape de inser-

țiile vertebrale, se ridică plastronul toracic, evidențiind organele cavității toracice. Se prelevează fragmente din diferite viscere, în recipiente sterile, în vederea examenului bacteriologic și anatomopatologic sau, preferabil, însămînțările se fac din viscerele aflate în poziția anatomică normală.

Pentru efectuarea de hemoculturi din cadavrul necropsiat, se fixează cordul cu o pensă, se cauterizează suprafața ventriculului drept cu o spatulă încălzită și se puncționează ventriculul cu o pipetă Pasteur, sterilă, extrăgându-se o cantitate de sînge care se însămînțează imediat pe medii de cultură adecvate. Din celelalte organe, însămînțările se practică după tehnica obișnuită.

După necropsie, cadavrele se distrug prin ardere, iar tăvile se sterilizează prin autoclavare sau cu ajutorul substanțelor chimice.

Determinarea dozei letale minime (DLM)

Doza letală minimă reprezintă cantitatea minimă de germeni capabilă să reproducă o infecție mortală la o anumită specie de animale de experiență. Ea este dependentă de o serie de factori, dintre care cei mai importanți sînt tulpina bacteriană inoculată, specia de animale de experiență folosită pentru determinare, calea de inoculare, vîrsta și greutatea animalelor de experiență etc.

Pentru inoculare se pot folosi culturi microbiene de 24 de ore în mediu lichid (bulion), suspensii de germeni rezultate prin spălarea unor

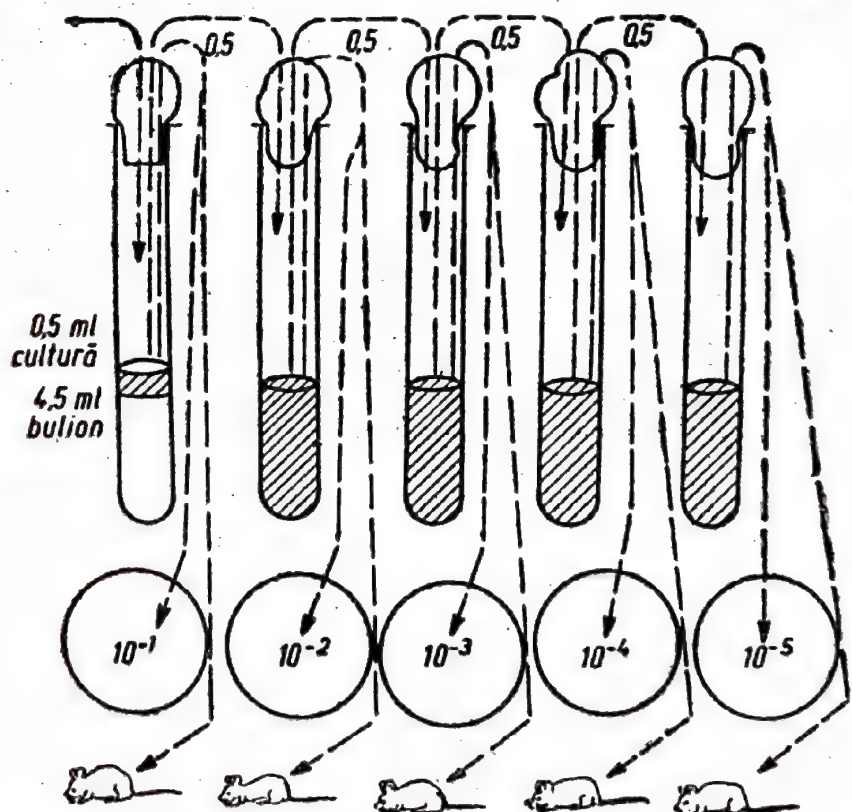


Fig. 44 — Schema determinării dozei minime letale (după Valeria Bica Popii)

culturi proaspete pe medii solide sau prin suspensionarea în soluție fiziologică a unei cantități de cultură de pe mediul solid.

DLM se exprimă fie prin numărul de germeni, fie prin diluția maximă exprimată exponențial. Prima modalitate este posibilă în cazul speciilor care pot fi numărate prin una din metodele bacteriologice. Mai frecvent se folosește exprimarea prin diluția maximă capabilă să provoace o infecție mortală. Ea se referă fie la unitatea de volum (în cazul germinilor din cultură de 24 de ore în bulion), fie la unitatea de greutate (în cazul germenilor raclați de pe medii solide sau al organelor bogate în germeni).

Pentru determinare sînt necesare: eprubete, pipete gradate, mojar, seringi și ace sterile, diluant steril, corespunzător speciei microbiene în cauză (bulion, soluție fiziologică tamponată etc.), materialul microbial de testat și un număr suficient de animale de experiență.

Tehnica de lucru. Se repartizează diluantul în eprubete sterile (de preferință în boxă sterilă), în cantitate de 4—5 ml în fiecare eprubetă, în cazul că se folosesc diluții din 10 în 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} etc.). Se adaugă în primul tub 0,5 ml material microbial, realizîndu-se în acest fel diluția de 1/10 (10^{-1}). După omogenizare, cu o altă pipetă sterilă, se trec 0,5 ml din eprubetă cu diluția 1/10 în eprubeta următoare, realizîndu-se diluția 1/100 (10^{-2}) și așa mai departe, pînă la realizarea întregii scări cu care se va lucra. Imediat, se trece la inocularea loturilor de animale, începînd cu diluția maximă (conținînd deci, cel mai mic număr de germeni) și terminînd cu cea mai mică (conținînd cel mai mare număr de germeni), deci în sens invers față de efectuarea diluțiilor. Faptul acesta permite să se folosească aceeași seringă pentru toate diluțiile, fără a fi necesară fierberea ei între diluții. Din fiecare diluție se inoculează cel puțin 2 animale. Animalele inoculate se marchează, folosindu-se diferite procedee, după posibilități, avîndu-se grija de a se nota corect codul marcării.

Animalele inoculate se țin sub observație o perioadă care corespunde răstimpului maxim în care agentul microbial inoculat produce infecții mortale la specia respectivă. Se notează cazurile mortale pe măsură ce animalele sucombă și se efectuează examenul bacteriologic în vederea excluderii eventualelor infecții intercurrente.

Dacă proba se execută corect, animalele vor muri într-o anumită ordine: primele, mor cele inoculate cu doza maximă, după care urmează cele inoculate cu diluții mai mari (cantități mai reduse de germeni). Între durata infecției și mărimea dozei, în general, trebuie să existe o proporție inversă. O asemenea lucrare este corectă cînd animalele inoculate cu diluția minimă mor în proporție de 100% iar cele inoculate cu diluția maximă rezistă în proporție de 100%.

Doza letală (DL) se poate aprecia fie sub formă de doză letală 100%, DL_{100} sau DLM, fie ca doză letală 50% (DL_{50}). În primul caz concluziile sînt mai aproximative și constau în exprimarea diluției maxime capabile să omoare 100% din animalele inoculate. Aproximația acestui mod de exprimare constă în aceea că de regulă mor animalele inoculate cu diluții superioare dozei care a produs moartea la 100% din animalele inoculate, așa încît DL reală este situată între diluția maximă care a produs moartea a 100% din animale și diluția la care 100% din animale au rezistat. Pentru acest motiv a fost căutat un mod de exprimare care să

reflecte mai real această relație dintre însușirile patogene ale tulpinii și reactivitatea animalelor. Un astfel de mod de exprimare a fost elaborat de REED și MUENCH, în 1938 și are la bază câteva principii esențiale:

— numărul minim de animale inoculate cu fiecare diluție (doză) trebuie să fie 5;

— diluția critică 50% trebuie să fie încadrată de cel puțin două diluții superioare și două diluții inferioare;

— în calcularea rezultatului se aplică metoda totalurilor cumulative, adică adunarea pentru fiecare diluție a tuturor animalelor care au murit, plecând de la diluțiile minime și pînă la diluția respectivă. Se obține în acest fel valoarea letalității cumulative și, prin același raționament, valoarea supraviețuirii cumulative.

De exemplu, pentru a calcula DL_{50} pentru o tulpină microbiană patogenă, se vor face 8 diluții succesive (10^{-1} — 10^{-8}) și pentru fiecare din ele vor fi inoculați cîte 5 șoareci, avînd aproximativ aceeași greutate și aceeași vîrstă, deci în total 40 de șoareci. Rezultatele vor fi înscrise într-un tabel (tabelul 2).

Tabelul 2

Calcularea DL_{50}

Nr. crt.	Diluția	Nr. șoarecilor			Totaluri cumulative		Exprimarea procentuală a morților
		Inoculați	Morți	Supraviețuitori	Morți	Supraviețuitori	
1	10^{-1}	5	5	0	24	0	100%
2	10^{-2}	5	5	0	19	0	100%
3	10^{-3}	5	4	1	14	1	93%
4	10^{-4}	5	4	1	10	2	83%
5	10^{-5}	5	3	2	6	4	60%
6	10^{-6}	5	2	3	3	7	30%
7	10^{-7}	5	1	4	1	11	8%
8	10^{-8}	5	0	5	0	16	0%

Cifrele din coloanele „totaluri cumulative” se obțin prin adunarea valorilor înscrise în coloana „Nr. șoarecilor”, după cum urmează:

În coloana „morți”:

— cifra 24 de la diluția 10^{-1} reprezintă șoarecii morți la diluția respectivă, plus cei morți la toate diluțiile superioare, deci $5 + 5 + 4 + 4 + 3 + 2 + 1$;

— cifra 19 de la diluția 10^{-2} reprezintă șoarecii morți la diluția respectivă, plus cei morți la toate diluțiile superioare, deci $5 + 4 + 4 + 3 + 2 + 1$;

— cifra 14 de la diluția 10^{-3} reprezintă șoarecii morți la diluția respectivă plus cei morți la toate diluțiile superioare, deci $4 + 4 + 3 + 2 + 1$, ș.a.m.d.

În coloana „exprimarea procentuală a morților” :

— procentul de șoareci morți se raportează la suma șoareci morți + șoareci supraviețuitori (totaluri cumulative). Procentul la diluția 10^{-1} rezultă raportând cifra 24 la $24 + 0$ (100%), la diluția 10^{-2} , 19 la $19 + 0$, (100%), la diluția 10^{-3} , 14 la $14 + 1$, (93%), la diluția 10^{-4} , 10 la $10 + 2$, (83%), la diluția 10^{-5} , 6 la $6 + 4$, (60%), la diluția 10^{-6} , 3 la $3 + 7$ (30%), la diluția 10^{-7} , 1 la $1 + 11$ (8%) iar la diluția 10^{-8} , 0 la 16 (0%).

Din tabel rezultă că diluția care ar produce mortalitatea a exact 50% din animalele inoculate se află situată între diluția de 10^{-5} , care omoară 60% din șoareci și diluția 10^{-6} , care omoară 30%. Pentru a afla exact diluția care ar corespunde unei letalități de 50% se calculează factorul de corecție după următoarea formulă :

$$F = \frac{(A - B)(C + D)}{2(AD - BC)} \quad \text{în care :}$$

A = numărul șoarecilor morți la diluția imediat inferioară celei care ar fi omorât 50% (în cazul de față 6, corespunzător diluției 10^{-5})

B = numărul șoarecilor care au supraviețuit la aceeași diluție (în cazul de față 4)

C = numărul șoarecilor morți la diluția superioară celei care ar fi omorât exact 50% (în cazul de față 3)

D = numărul șoarecilor care au supraviețuit la aceeași diluție (în cazul de față 7).

Ca urmare :

$$F = \frac{(6 - 4)(3 + 7)}{2(6 \times 7) - (4 \times 3)} = \frac{2 \times 10}{2(42 - 12)} = \frac{20}{60} = 0,33$$

Acest factor se adună cu exponentul 5 (de la diluția 10^{-5} care omoară 60% din șoareci) și se obține rezultatul că diluția care produce moartea a 50% din animale este de $10^{-5,33}$ sau, mai simplu :

$$\frac{\text{Procentul morților la diluția superioară} - 50}{\% \text{ morților la dil. sup. lui } 50\% - \% \text{ morților la dil. infer. lui } 50\%} = \frac{60 - 50}{60 - 30} = \frac{10}{30} = 0,33$$

care se adaugă la exponentul diluției superioare = $10^{-5,33}$.

Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs

În lucrările de bacteriologie legate de igiena alimentelor, a apei, a ustensilelor folosite în industria produselor de origine animală, a mediului ambiant, se impune determinarea numărului de bacterii pe unitatea de volum sau suprafață. Ea oferă indicii prețioase cu privire la salubritatea apei, aerului, produselor alimentare etc. constituind substratul măsurilor restrictive care se impun. De asemenea, determinarea numărului de germeni este necesară în cazul controlului unor produse biologice (vaccinuri, seruri etc.).

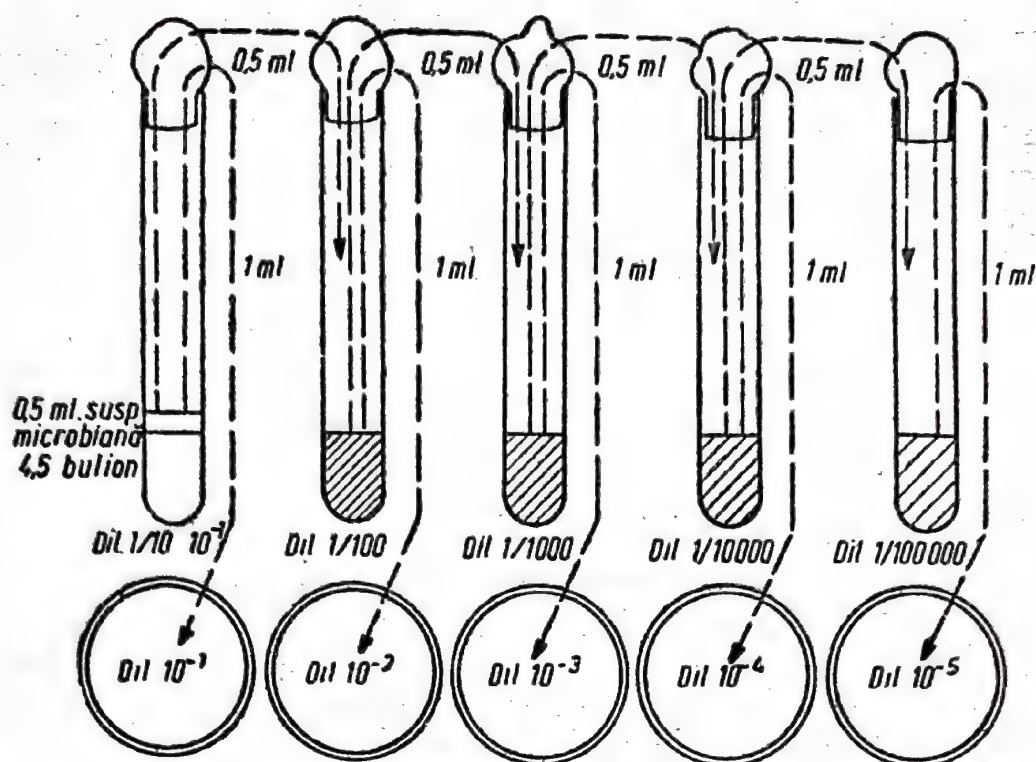


Fig. 45 — Schema efectuării diluțiilor și însămînțării pentru numărătoarea bacteriilor în plăci (după Valeria Bica Popii)

În acest scop se pot aplica două metode mai importante:

- metoda culturilor în plăci;
- metoda nefelometrică.

Metoda culturilor în plăci. Materialul de examinat se recoltează în condiții de asepsie cât mai riguroasă și se fac diluții progresive, din 10 în 10, în bulion. Pentru aceasta, se pun câte 4,5 ml bulion în atâtea eprubete sterile câte diluții sînt necesare a se face (în funcție de bogăția de germeni ce se presupune). În primul tub se adaugă 0,5 ml din suspensia de cercetat și se omogenizează. Se obține astfel diluția de 1/10. Cu altă pipetă gradată se trec 0,5 ml în tubul al doilea și se omogenizează prin aspirații și refulări repetate, obținîndu-se diluția de 1/100. Se procedează în mod similar, schimbîndu-se la fiecare diluție pipeta, pînă la ultimul tub.

Din diluțiile astfel realizate se fac însămînțări în plăci Petri sterile, punîndu-se câte 1 ml din fiecare diluție, în fiecare placă. Pentru o mai mare precizie se pot însămînța, din aceeași diluție, câte 2—5 plăci. În fiecare placă se toarnă apoi, peste suspensia respectivă, agar topit și răcit la 45°C și se omogenizează temeinic, astfel încît bacteriile să se răspîndească uniform în mediul nutritiv, în vederea obținerii de colonii izolate. Se apreciază că o colonie izolată este rezultatul multiplicării unei singure celule bacteriene.

Plăcile se incubează la 37°C 24—48 ore, după care se numără coloniile care s-au dezvoltat în grosimea stratului de agar, la fiecare diluție. Numărătoarea se poate face direct sau cu ajutorul unei lupe.

Dacă numărul coloniilor din plăci este mare, numărarea lor se face cu ajutorul unei plăci împărțită în suprafețe de câte 1 cm². Cel mai frec-

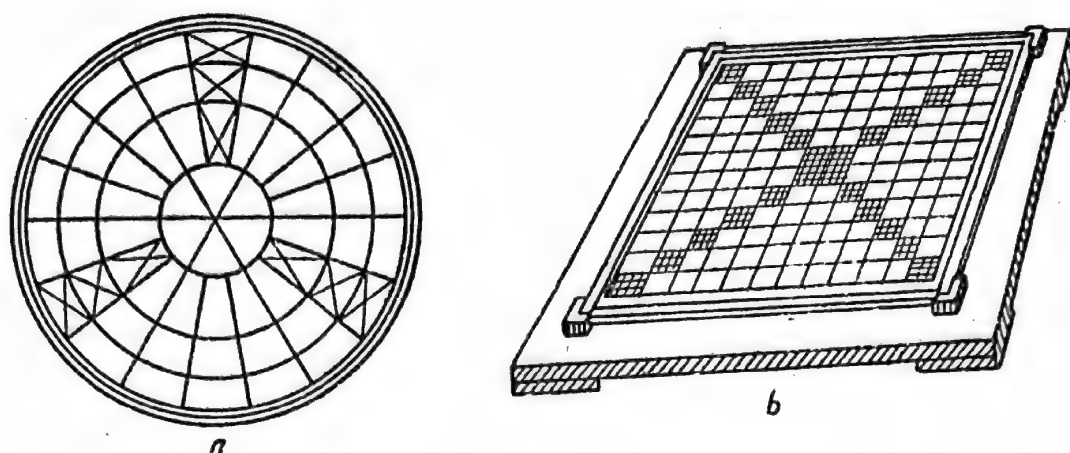


Fig. 46 — Plăci pentru numărătoarea coloniilor bacteriene pe medii solide
a — placa Lafar; b — placa Wolfhügel

vent folosite sînt plăcile Wolfhügel și Lafar. Prima are 144 pătrate de cîte 1 cm^2 , secunda este circulară și este divizată în 6 sectoare, fiecare subîmpărțit în cîte 10 suprafețe de 1 cm^2 .

Placa respectivă se așază sub placa Petri și se numără coloniile din 10—20 suprafețe de cîte 1 cm^2 . Media coloniilor pe 1 cm^2 se înmulțește apoi cu suprafața plăcii, obținîndu-se numărul total de germeni din placă, deci din 1 ml de suspensie. Pentru a afla numărul total de germeni din materialul de examinat, numărul coloniilor dintr-o placă se înmulțește cu diluția respectivă. De exemplu, dacă numărul de colonii dintr-o placă însămîntată din diluția $1/100\,000$ (10^{-5}) este de 25, înseamnă că în materialul inițial au fost $25 \times 100\,000 = 2\,500\,000$ germeni.

Pentru ca rezultatele să fie și mai precise se va face calculul pentru mai multe plăci și în final se face media valorilor obținute.

Metoda nefelometrică se bazează pe folosirea unor scări nefelometrice preparate din pulberi inerte (sticlă pirex pisată), din diferite săruri (clorura de bariu) sau diluții standard de germeni. În practică cel mai frecvent se folosesc scările Brown și McFarland pe bază de clorură de bariu. Fiecărui tub, avînd un anumit grad de turbiditate, îi corespunde cu aproximație o anumită concentrație de germeni.

Pentru determinare se fac suspensii de germeni omogene, care se compară ca turbiditate, cu tuburile din scara folosită. Aprecierea este desigur aproximativă, mai ales dacă se face cu ochiul liber. Metoda se folosește numai în cazul culturilor sau suspensiilor bacteriene, nu și a altor produse.

Obținerea bacteriocinelor

Bacteriocinele sînt substanțe active, elaborate de unele bacterii, avînd o acțiune letală pentru celule bacteriene sensibile, pe suprafața cărora se fixează prin intermediul unor receptori specifici. Spre deosebire de antibiotice, bacteriocinele au un spectru îngust de activitate în sensul că acțiunea lor este condiționată de existența receptorilor celulari specifici.

La ora actulă bacteriocinele sînt clasificate în 2 grupe principale:

a) bacteriocinele fără o structură corpusculară, cu greutate moleculară joasă, nesedimentabile, termostabile, tripsinosensibile; din punct de vedere al constituției chimice sînt foarte heterogene: de natură enzimatică (megacina A, bacteriocinele enterococilor B), lipopolizaharidică (megacinele, stafilococinele, colicina K), proteică (colicinele A, E₁, E₂, E₃, piocinele A₂, A₃) complexă (colicina V);

b) bacteriocinele corpusculare au o structură asemănătoare fagilor compleți, incompleți sau unor componente fagice (capete sau cozi). Sînt sedimentabile, termostabile, tripsinorezistente. Astfel sînt monocinele, bacteriocinele genului *Bacillus*, vibriocina, colicina 15, majoritatea piocinelor (R, R₂, R₃, R₄, R₂₈, C₉, K₃₅, ST₆, TTC, R_{mc}, A₁ etc.).

Pe lângă aceste două grupe se pare că, recent, au fost identificate bacteriocine cu caractere intermediare cum este megamicina C_x (Kiling principle) de natură proteică, care, deși termolabilă și tripsino-rezistentă, nu are nimic din constituția fagului.

Spre deosebire de antibiotice care sînt substanțe cu greutate moleculară mică și care pătrund în celula bacteriană inhibînd procesele enzimatice ale acesteia sau lezînd ADN-ul celular, cu blocarea funcției de matriță, în cazul bacteriocinelor doar o cantitate mică (cca 10%) pătrunde prin învelișul celular, pentru a se fixa pe fracțiunile ribozomale, restul rămînînd legat de înveliș. Frațiunea care pătrunde în celulă (fracțiunea solubilă) este responsabilă de efectele letale.

Bacteriocinele au o acțiune bacteriostatică, bactericidă și bacteriolitică, ce se desfășoară în 3 trepte: adsorbția, instalarea alterărilor biochimice celulare și producerea alterărilor morfologice.

Ele joacă un rol important în antagonismul microbial. Pentru activitatea de laborator ele sînt importante sub raportul posibilităților de bacteriocinotipie și respectiv bacteriocinogenotipie, ce se pot aplica în cazul unei serii de bacterii (*Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* etc.). O parte din ele au fost încercate și în terapeutică (colicinele, enterocinele, pot inhiba îmbolnăvirile cu *Clostridium perfringens*, *septicum*).

Detectarea tulpinilor bacteriocinogene se poate face prin metoda dublului strat de agar. În acest scop se procedează astfel:

— se însămînțează tulpinile prezumtiv bacteriocinogene prin înțepare în agar, în plăci Petri (într-o placă pot fi însămînțate mai multe tulpini microbiene; în acest caz pe fundul plăcii se însemnează fiecare tulpină cu indicativul corespunzător);

— se incubează 48 de ore la 37°C;

— se inactivează culturile cu cloroform, punîndu-se cîteva picături pe capacul plăcii și lăsîndu-se 15—30 minute la temperatura camerei; vaporii de cloroform nu alterează bacteriocinele elaborate și difuzate în mediu;

— se însămînțează, peste cultura primară inactivată, tulpina bacteriană indicatoare (sensibilă) incorporată în agar 1,7% topit și răcit la 45°C (0,1 ml cultură proaspătă în bulion la 4—5 ml agar);

— se incubează 24 de ore la 37°C după care se face interpretarea: în dreptul tulpinilor bacteriocinogene se produc zone de inhibiție ușor de decelat.

Se poate recurge și la metoda prin spotare, în care se depun picături (spoturi) din culturile presupuse a fi bacteriocinogene, în puncte

separate, spre periferia plăcii Petri, cu agar nutritiv. Se incubează 48 de ore, se tratează cu cloroform, după care peste culturile rezultate, se depun picături din cultura în mediu lichid, a tulpinii sensibile, astfel încât să depășească marginile culturii inițiale. Se incubează la 37°C, timp de 24 de ore și se interpretează rezultatele: în dreptul tulpinilor bacteriocinogene se vor observa zone de inhibiție.

Se poate folosi, de asemenea, tehnica însămînțărilor liniare perpendiculare.

Identificarea bacteriocinelor obținute se face prin compararea specificității lor față de tulpinile sensibile cu specificitatea unor bacteriocine standard.

Prepararea bacterinelor

Practica de teren impune adesea prepararea unor mijloace de imunoprofilaxie specifică față de unele îmbolnăviri cu caracter local (infecții de grajd, interesând un număr mai mult sau mai puțin ridicat de animale sau indivizi izolați) și față de care nu se dispune de vaccinuri preparate pe plan centralizat. Prepararea unor vaccinuri cu tulpini „de focar” devine adesea singura măsură specifică salutară în rezolvarea unor situații epizootologice particulare.

Pentru prepararea bacterinelor din diferiți germeni, există diferite procedee dintre care cele mai simple și în același timp corespunzătoare se bazează pe următoarele:

a) cultivarea germenilor pe medii adecvate. Culturile pe medii lichide necesită o prelucrare mai redusă decât cele pe medii solide, deși acestea din urmă realizează concentrații mai ridicate de germeni pe unitatea de volum. În cazul germenilor mai puțin pretențioși (coliformi, salmonele, pasteurele, stafilococi etc.) se poate face cultivarea pe medii obișnuite. În cazul germenilor serofili (streptococi) se adaugă ser steril în proporție de 2—5% care, pentru a evita șocul, este preferabil să provină de la aceeași specie animală cu aceea pentru care se prepară bacterina;

b) bulionul se repartizează în flacoane în cantități de câte 250 ml, în cazul când este nevoie de cantități mai mari de bacterină.

Pentru fiecare flacon se însămînțează câte un tub conținând 5—10 ml bulion, cu tulpina bacteriană respectivă și se incubează la 37°C. Când turbiditatea din tuburi este evidentă sau se apreciază că dezvoltarea este maximă, se fac frotiuri pentru controlul purității culturii. Dacă ea este pură, fiecare flacon conținând 250 ml mediu, încălzit în prealabil la 37°C, se însămînțează cu cantitatea de cultură conținută de un tub. Flacoanele sînt incubate apoi 18—24 de ore (dacă este nevoie și mai mult). Pentru a mări concentrația culturii se poate folosi aerarea sau agitarea periodică;

c) cînd se apreciază că cultura s-a dezvoltat suficient, se face controlul purității prin examenul morfologic în frotiuri. Dacă este pură, se formolează 0,3% și se mertiolează 1/10 000 (mertiolatul este necesar pentru a inhiba dezvoltarea ciupercilor). În cazul stafilococilor inactivarea se face mai frecvent prin încălzire la 56°C timp de o oră în prezența fenol-

lului în proporție de 0,5%. Cultura astfel tratată se incubează apoi 18—24 de ore la 37°C și se supune următoarelor teste de sterilitate și inocuitate:

1 — se inoculează câte 0,1 ml bacterină din fiecare flacon, în câte două tuburi cu bulion obișnuit și câte două tuburi cu bulion cu ficat. Două tuburi (din fiecare mediu câte unul) se incubează la termostat la 37°C iar celelalte două la temperatura camerei, timp de o săptămână;

2 — se inoculează câte 3 șoareci adulți, pe cale subcutanată cu câte 0,2 ml bacterină și se țin în observație 1 săptămână;

3 — dacă tuburile însămînțate rămân sterile iar șoarecii rămân sănătoși, bacterina se poate folosi;

4 — dacă este posibil se inoculează un animal din specia pentru care s-a preparat bacterina, pentru a vedea dacă apar sau nu reacții nedorite.

Bacterina trebuie notată cu date privind tipul, utilizarea, doza, conservarea, data preparării.

Dacă este necesară o cantitate redusă de bacterină (pentru un singur animal) este preferabilă cultivarea pe geloza sînge. Cultura se spală cu o cantitate mică de soluție salină formolată 0,3%, se incubează, apoi se diluează cu o soluție salină fenolată 0,5% pînă la turbiditatea dorită. Pentru animalele mici se preferă ca conservant fenolul, deoarece spre deosebire de formol, nu produce iritații evidente. Se fac aceleași teste de sterilitate și inocuitate.



Examenenele serologice ca metode de decelare a infecțiilor bacteriene și virale la animale

Conflictul activ între macro- și microorganism are ca rezultat, în afară de producerea unor tulburări morfologice și funcționale, și o mobilizare a resurselor defensive, capabile să facă față infecției și să restabilească echilibrul fiziologic în organism. Aceste resurse presupun mijloace variate: elaborarea de substanțe bactericide (conținute de diferite secreții, umori și elemente celulare ca: lizozimul, betalizina, leucinele, plakinele, alexina, properdina, bactericidina), capacitatea de a îngloba și distruge germeni (fagocitoza) sau producția unor elemente specifice, ca răspuns la incitarea provocată de diferitele tipuri de agenți patogeni. Aceste elemente specifice sînt anticorpii și au rolul de a neutraliza valențele nocive ale microorganismelor sau substanțelor străine organismului.

După natura lor și după modul lor de acțiune, anticorpii pot fi aglutinanți, precipitanți, neutralizanți, fixatori de complement, sensibilizanți. Pe aceste însușiri, care presupun cuplarea specifică a anticorpilor cu antigenele, se bazează o serie de reacții cu valoare diagnostică uneori deosebit de importantă.

Aceste reacții imunologice pot fi folosite în două scopuri mai importante:

a) precizarea diagnosticului unor stări patologice pe baza decelării în sînge, secreții sau diferite țesuturi a anticorpilor specifici care au luat naștere în organism, în urma contactului cu agentul etiologic respectiv. În acest scop, se folosesc unul sau mai multe antigene cunoscute, căutîndu-se, prin reacțiile serologice, identificarea anticorpilor. Trebuie specificat că aceste reacții dispun de un înalt grad de specificitate, în sensul că cuplarea antigenului se face numai cu anticorpii corespunzători, deci pozitivitatea indică fie boala în cauză, fie contactul anterior al organismului cu agentul etiologic respectiv;

b) identificarea agentului etiologic care a provocat starea de boală, folosindu-se seruri cunoscute, preparate în prealabil pe animale de experiență. Dispunîndu-se de serii variate de asemenea seruri, dotate cu o înaltă specificitate și izolîndu-se în stare pură agentul cauzal, prin mijloace de laborator, se poate stabili, cu ajutorul reacțiilor serologice, genul, specia sau tipul care a determinat procesul patologic. Faptul este important atît pentru precizarea diagnosticului, cît și sub raport profilactic, permițînd instituirea celor mai adecvate măsuri de prevenire. Așa de exemplu, stabilirea exactă a serotipului de leptospire dintr-un focar are o mare importanță

în aplicarea vaccinărilor cu serotipurile care acționează în acel focar, asigurând în acest fel reușita acțiunilor de imunoprofilaxie specifică.

Elementele necesare oricărei reacții serologice sînt:

— antigenul constituit dintr-o suspensie microbiană (vie, atenuată sau inactivată) dintr-un extract (microbian, organic etc.), o suspensie de organe, secțiuni la criotom (pentru imunofluorescență) etc.;

— anticorpus aflat în serul sau secrețiile animalelor bolnave sau trecute prin boală.

Pe lângă aceste două elemente indispensabile, sînt necesari electroliți, iar în unele reacții serologice mai intră și o serie de elemente care, fie că favorizează vizualizarea reacției, fie că permit evidențierea mai pregnantă a intensității reacțiilor (coloranți, ioni marcați, sisteme indicator nespecifice etc.). Intensitatea unei reacții este variabilă cu cantitatea de anticorpi existenți în serul respectiv, precum și cu unele condiții de desfășurare a acesteia. În general, ea se notează cu + + + +, + + +, + +, +, ± și —, după criterii variabile, în funcție de natura reacției.

Pentru a mări gradul de obiectivitate a reacțiilor serologice, este necesar să se folosească întotdeauna martori. Aceștia sînt și ei variabili, în funcție de reacție, dar, în principiu, minimum doi sînt strict necesari: martorul pentru reacția pozitivă și cel pentru reacția negativă. La aceștia se mai adaugă după caz, martorii pentru diluant și alte elemente care intră în reacție. Ei sînt în măsură să certifice că reacția s-a efectuat între parametri optimi și că, deci, rezultatele ei sînt corecte. Depistarea în organismul animalelor bolnave, suspecte sau trecute prin boală, a anticorpilor specifici, constituie, ca urmare, procedee de a cunoaște natura proceselor infecțioase și permit orientarea justă a măsurilor de prevenire sau combatere.

Dintre cele mai importante reacții serologice folosite în practica de diagnostic, pot fi enumerate următoarele:

A) *Hemoaglutinarea rapidă pe lamă (RHAR)* constă în punerea în contact a sîngelui integral, proaspăt recoltat, cu un antigen destinat special acestui scop. Existența anticorpilor specifici în sîngele cercetat se soldează cu aglutinarea particulelor de antigen sub forma unor grămezi vizibile cu ochiul liber. Spre exemplificare va fi dată mai jos, tehnica reacției de hemoaglutinare rapidă pe lamă în tifopuloroză.

Pentru efectuarea reacției este nevoie de următoarele:

- lame de sticlă curate și bine degresate;
- anse metalice cu diametrul ochiului de 3 mm;
- flacără pentru flambarea anselor (lămpi de spirt, benzină sau aragaz);
- pipete Pasteur sau seringi de 1 ml cu ac fin, pentru repartizarea antigenului pe lame;
- vată, alcool, foarfece;
- apă distilată sau ser fiziologic, într-un vas de sticlă;
- cuști pentru izolarea exemplarelor pozitive, precum și pentru izolarea celor cu alte afecțiuni (tbc, leucoză, micoplasmoză etc.);
- antigen pullorum (suspensie în apă distilată hiperclorurată și citratată, de corpi microbieni de *Salmonella pullorum*) conservat corespunzător și agitat înainte de utilizare;
- ajutoare pentru prindere și contenționare.

Reacția se execută într-o încăpere închisă, fără curenți de aer și fără praf, bine luminată natural, în care temperatura să fie de 18—20°C.

Tehnica de lucru. Se depune pe lamă, cu pipeta Pasteur sau cu seringă, o picătură de antigen. După dezinfectia cu alcool a crestei și foarfecelui (necesară pentru a evita transmiterea în serie a unor boli infecțioase, cum ar fi de exemplu leucoza aviară) se taie puțin din vârful unui lob al crestei, lăsându-se să se scurgă primele 2—3 picături de sînge. Cu ansa acului se recoltează o picătură de sînge, care se amestecă cu cantitatea de antigen de pe lamă. După fiecare recoltare, ansa acului se spală prin introducerea în vasul cu apă distilată, apoi se flambează și se răcește. Amestecul de pe lamă se omogenizează bine, prin înclinări repetate, iar după 3 minute se face citirea. Reacția poate fi: negativă cînd amestecul antigen-sînge rămîne omogen și pozitivă, cînd în amestec apar granule albicioase, grunjoase, întii la periferia picăturii, apoi în toată masa amestecului, în timp ce restul lichidului se limpezește. Acești grunji cresc în dimensiuni prin confluare. Trebuie subliniat faptul că grunji au o culoare albă-cenușie și nu trebuie confundați cu eventuale aglutinate de hematii care au o culoare roșie. Se pot întîlni și reacții întîrziate, cînd abia la sfîrșitul celor 3 minute încep să apară aglutinatele. În aceste cazuri, operația se repetă, punîndu-se în aceeași cantitate de antigen 2—3 anse de sînge, iar observația se va prelungi 4—5 minute.

În cazul reacției de hemoaglutinare pentru diagnosticul tuberculozei la păsări, se procedează în aceeași manieră, doar că se folosește un antigen micobacterian, preparat din tulpini de *M. avium*, suspensionate în soluție fiziologică tamponată.

În cazul brucelozei la mamifere, antigenul folosit pentru RHAR, este colorat cu feniltetrazolium citratat și are culoarea roșie-violacee, ceea ce face mai dificilă interpretarea.

B) *Seroaglutinarea rapidă pe lamă* se bazează pe același principiu, doar că în loc de sînge integral se folosește serul exprimat de singele recoltat de la indivizii suspecti. Se practică, mai ales cînd operațiunea nu se face la locul recoltării, fiind necesar transportul probelor la laborator. Se folosește, de asemenea, în munca de tipizare în laboratoare, cînd se pun în contact seruri cunoscute cu germeni necunoscuți. În acest fel se poate pune un diagnostic operativ (*E. coli*, *Salmonella*).

În acest din urmă caz, se folosește tot un antigen corpuscular — suspensia bacteriană obținută prin spălarea culturilor pe agar, sau prin omogenizarea, direct pe lamă, a unei picături de soluție fiziologică cu o cantitate de cultură raclată de pe mediile solide. Suspensiile trebuie să fie dense și omogene. Tulpinile care aglutinează spontan, numai datorită electrolitilor conținuți de soluția fiziologică, nu pot fi folosite în acest scop. Pentru aprecierea reacției este de asemenea necesar controlul acțiunii serului normal al speciei de la care provine serul respectiv asupra antigenului. Dacă serul normal al unei specii conține aglutinine nespecifice față de antigenul cu care se lucrează, înseamnă că el nu se pretează pentru practicarea diagnosticului serologic.

Citirea reacției de seroaglutinare rapidă se face prin aprecierea intensității și rapidității cu care se produce aglutinarea corpurilor bacterieni din antigen. Înclinarea repetată a lamei pe care s-a făcut amestecul de antigen și ser, accelerează apariția aglutinatelor. Aglutinarea poate fi de tip granular (particule mici) sau de tip floconos (particule mari). Primul

este de regulă propriu reacțiilor care se petrec între antigen și anticorpii somatici, iar secundul între antigen și anticorpii flagelari. Pentru a ușura observarea apariției aglutinării este bine ca citirea reacției să se facă pe un fond închis (un carton sau o hîrtie de culoare neagră). Uneori reacția este atît de discretă încît numai cu greutate se poate observa apariția granulelor în amestec. În acest caz se poate recurge la examinarea la lupa obișnuită sau la un dispozitiv special destinat acestui scop (aglutinoscop).

C) *Seroaglutinarea lentă (RSAL)*, în tuburi, are avantajul, față de precedentele, că permite și stabilirea titrului anticorpilor din serul suspect, ceea ce adesea dă indicii prețioase asupra stadiului procesului infecțios. Așa de exemplu, în unele boli cu evoluție lentă, examene serologice repetate, prin determinarea titrurilor anticorpilor, permit aprecierea dinamicii acestora și, implicit, evaluarea caracterului evolutiv al infecției.

Pentru efectuarea reacției se pune în contact suspensia de antigen cu diluții variabile de ser suspect și se urmărește, după o incubajie corespunzătoare, apariția fenomenului de aglutinare, tradus prin formarea, la fundul eprubetelor — în cazul în care reacția este pozitivă — a unui depozit caracteristic, însoțit de clarificarea stratului superior. În funcție de concentrația anticorpilor, aglutinarea va fi prezentă într-un număr mai mare sau mai mic de tuburi din seria de diluții efectuate.

Intrepretarea reacției constă în observarea densității optice a lichidului supernatant și a gradului de depunere a aglutinatului la fundul eprubetelor. Intensitatea reacției depinde de cantitatea de anticorpi din serul de cercetat:

1 — aglutinarea completă, notată cu + + + +, constă în clarificarea totală a supernatantului și depozitarea particulelor aglutinate de antigen la fundul eprubetei, sub forma unei umbrelor răsturnate, datorită franjurării marginilor ce se întind și pe pereți (presupune aglutinarea a 100% din corpii bacterieni — antigen);

2 — aglutinarea aproape completă, notată cu + + +, constă în clarificarea 75% a supernatantului și un depozit asemănător cu precedentul, dar mai redus (presupune aglutinarea a peste 50% din antigen, dar nu 100%);

3 — aglutinarea moderată, notată cu + + constă în turbiditate moderată — 50% — a supernatantului, cu depozit mai redus, eventual umbreliform (presupune aglutinarea a aproximativ 50% din particulele de antigen);

4 — aglutinare slabă, notată cu +, constă în turbiditate mai intensă a supernatantului, aproape aceeași cu a tubului martor negativ și depozit redus (presupune aglutinarea a maximum 25% din antigen);

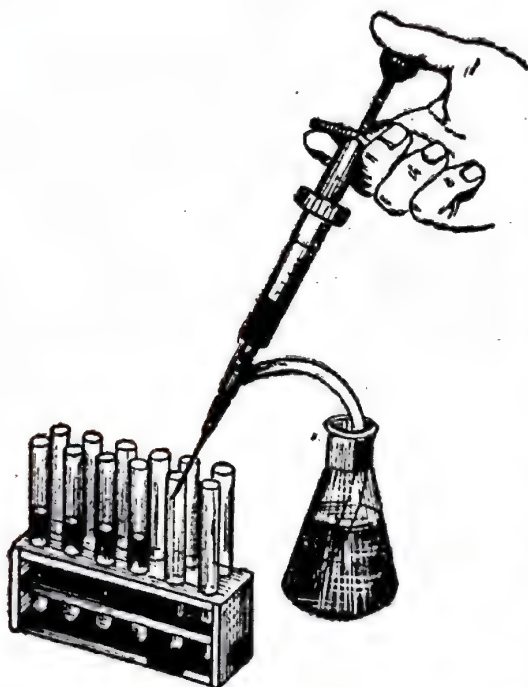


Fig. 47 — Distribuirea cu ajutorul seringii automate

5 — absența oricărei aglutinări, notată cu —, constă în turbiditatea supernatantului identică cu a tubului martor negativ.

Pentru o mai corectă exemplificare, va fi dată tehnica efectuării seroaglutinării lente pentru diagnosticul brucelozei la animale așa cum se practică ea în laboratoarele sanitare veterinare, la ora actuală.

Pentru executarea reacției sînt necesare:

— antigenul brucelic (aglutinogenul), preparat de I.C.V.B. „Pasteur“, al cărui titru și termen de valabilitate sînt indicate pe flacon. Păstrarea antigenului se face la $+4^{\circ}\text{C}$, Pentru ca rezultatele să fie comparabile cu cele obținute pe scară internațională, acest antigen este standardizat față de serul etalon internațional adoptat de O.M.S., O.I.E. și F.A.O. Antigenul este astfel dozat încît, în prezența unei diluții de 1/1000 a serului etalon să producă o aglutinare de intensitate notabilă cu ++ (50%);

— soluție fiziologică 8,5‰;

— serul de examinat, care trebuie să fie limpede și fără hemoliză;

— eprubete de reacție (100/12 mm), stativ, pipete, eventual seringi sau pipete automate de repartizare a ingredientelor.

Pregătirea antigenului. Flacoanele sau fiolele conținînd antigenul brucelic se omogenizează bine, după care se face suspensionarea în soluție fiziologică fenolată 5‰, în funcție de titrul indicat pe etichetă și în cantitate suficientă pentru numărul de probe care se pun în lucru în șarja respectivă. Pentru fiecare probă de ser se calculează un volum de 6,1 ml suspensie de antigen.

Deoarece în mod curent se lucrează cu diluțiile de ser 1/25, 1/50, 1/100, efectuate direct în antigen, pentru fiecare probă se vor pune în reacție 3 eprubete în care se repartizează următoarele cantități:

— prima eprubetă: 3,6 ml antigen în diluația de lucru + 0,15 ml ser de examinat; se va omogeniza prin aspirații și refulări repetate (de 4—6 ori) obținîndu-se diluția de 1/25;

— a doua eprubetă: 1 ml antigen + 1 ml amestec din prima eprubetă, obținîndu-se diluția 1/100.

Fiecare șarjă de probe va fi însoțită de un martor de ser pozitiv (brucelic) precum și un martor de ser sigur negativ.

Stativetele se pun la termostat la 37°C timp de 18—20 ore. După acest interval, se scot, se lasă în repaus 30 de minute (evitîndu-se orice agitare), după care se face citirea rezultatelor, de preferință la lumina zilei.

Titrul serului de examinat este dat de cea mai mare diluție în care s-a produs o aglutinare de intensitatea ++ (50%).

S-a stabilit că pentru taurine, bubaline și cabaline, serul care conține cel puțin 100 U.A.I./ml să fie considerat pozitiv (deci la diluția de 1/100, aglutinări notabile cu ++, +++ și ++++); serul care conține între 30 și 100 U.A.I./ml să fie considerat dubios (deci la diluția 1/25 aglutinări notabile cu ++, +++, la diluția de 1/50 aglutinări notabile cu +, ++ și +++, iar la diluția de 1/100, aglutinare notabilă cu +), iar serul cu mai puțin de 30 U.A.I./ml să fie considerat negativ (la diluția de 1/25 aglutinări notabile cu —, + și ++).

La porcine, ovine și caprine, serul conținînd cel puțin 50 U.A.I./ml este considerat pozitiv (la diluția de 1/50 aglutinări notabile cu ++,

+++ , ++++ și mai sus); serul conținând între 25 și 50 U.A.I./ml este considerat dubios (la diluția de 1/25 aglutinări notabile cu ++, +++, +++++, la diluția 1/50 aglutinare notabilă cu +), iar serul conținând sub 25 U.A.I./ml este considerat negativ (la diluția de 1/25, reacții notabile cu — și +). Valorile de convertibilitate a titrurilor aglutinante în titruri de unități internaționale sînt următoarele:

1/25	+	=	21 U.A.I./ml
1/25	++	=	25 U.A.I./ml
1/25	+++	=	30 U.A.I./ml
1/25	++++	=	36 U.A.I./ml
1/50	+	=	42 U.A.I./ml
1/50	++	=	50 U.A.I./ml
1/50	+++	=	60 U.A.I./ml
1/50	++++	=	72 U.A.I./ml
1/100	+	=	84 U.A.I./ml
1/100	++	=	100 U.A.I./ml
1/100	+++	=	120 U.A.I./ml
1/100	++++	=	144 U.A.I./ml

Pentru persoanele cu experiență, aprecierea intensității aglutinării se poate face cu ușurință vizual, dar se poate recurge și la compararea cu un set de eprubete conținând soluție fiziologică și suspensie de antigen (tabelul 3).

Tabelul 3

Aprecierea intensității aglutinării

Numărul eprubetei	Soluție fiziologică (ml)	Suspensie de antigen (ml)	Intensitatea transparenței
1	2	0	++++
2	1,5	0,5	+++
3	1	1	++
4	0,5	1,5	+
5	—	2	—

Pentru a fi exclusă o eventuală eroare de lucru și spre a se putea aprecia și absența unor aglutinări nespecifice, probele la care s-au obținut aglutinări se supun retestării. Examinarea se repetă după aceeași tehnică, concomitent cu unul din următoarele teste:

- inactivarea serului la 56—58°C timp de 30 minute și efectuarea reacției ca la 37°C;
- executarea reacției după tehnica obișnuită și incubarea la baie la 56°C timp de 18 ore.

Rezultatul aglutinării la probele repetate va fi dat după citirea și compararea rezultatelor din stativul cu reacția executată în mod obișnuit

și una din variantele expuse. În situația că se observă o scădere a titrurilor prin reacția-variantă, vor fi înregistrate acestea.

În cazul unor seruri provenite din efective bine cunoscute anterior ca indemne de bruceloză, la care s-au obținut reacții pozitive sau dubioase, acestea vor putea fi păstrate la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ și repetate prin RAL după 4—5 zile, pentru verificarea menținerii sau dispariției titrului aglutinant.

Toate probele care au dat aglutinări pozitive sau dubioase, indiferent de proveniența lor (efective cunoscute sau nu ca indemne) se vor examina și prin RFC.

Dacă se dorește alcătuirea unui alt tip de scară a diluțiilor (de exemplu $1/10$, $1/20$, $1/40$, $1/80$ etc.), se va proceda astfel: în prima eprubetă se pun 1,8 ml ser fiziologic, iar în următoarele (în număr variabil, în funcție de titrul pînă la care se dorește examinarea) cîte 1 ml ser fiziologic. În prima eprubetă se adaugă, 0,2 ml din serul suspect, realizîndu-se diluția de $1/10$, iar după omogenizare, se trece 1 ml în următoarea și așa mai departe.

Trebuie specificat că unele seruri, în concentrații mari, pot avea o acțiune aglutinantă nespecifică, datorită unor proteine serice. În acest caz, în interpretarea reacției nu se iau în considerare primele titruri, în care serul este încă în concentrație mare. Pentru o interpretare corectă, în acest caz se va lucra cu serii incluzînd diluții mai mari decît cele obișnuite.

Un alt fenomen, care poate crea dificultăți în interpretarea reacției de seroaglutinare este așa-numitul fenomen de zonă. În acest caz se

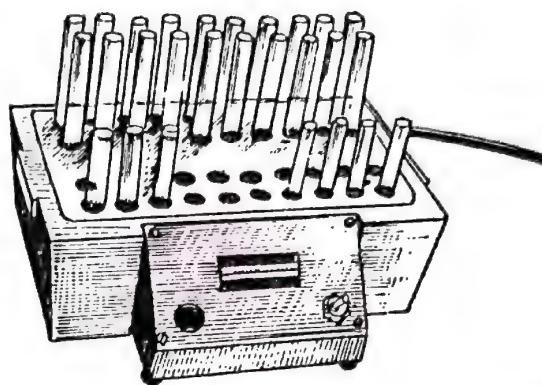


Fig. 48 — Tip de baie marină electrică pentru reacții de scurtă durată

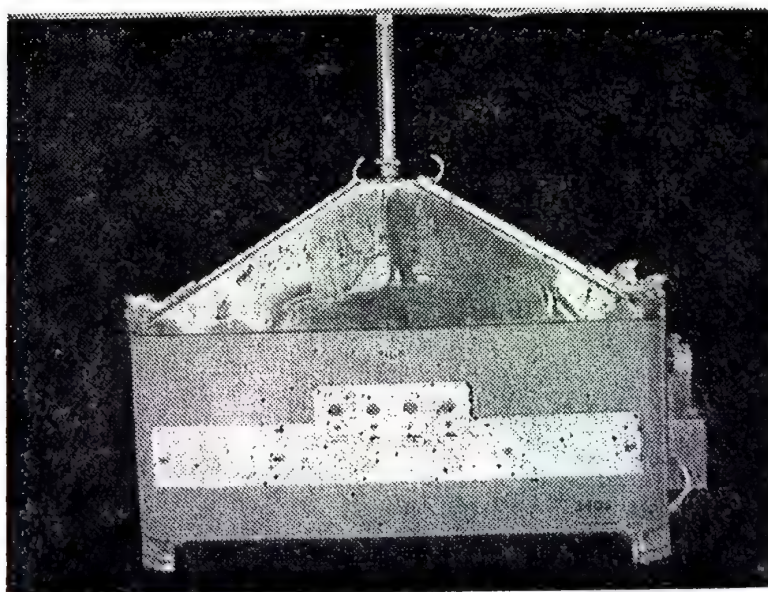


Fig. 49 — Baie de inactivare tip I.T.M.

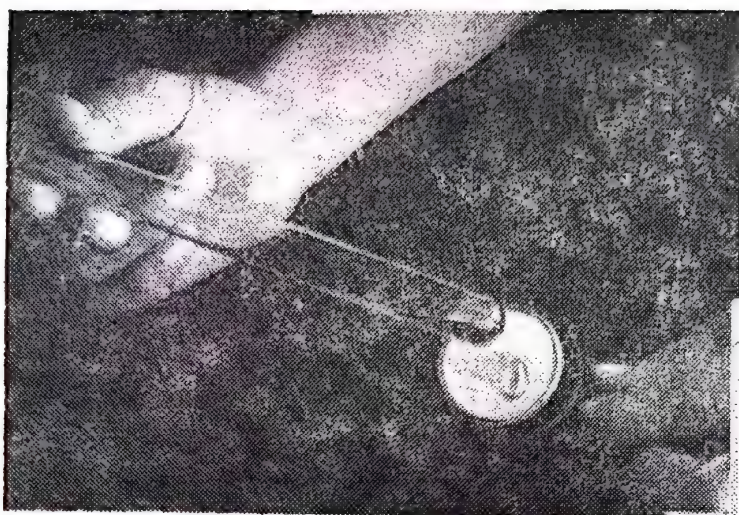


Fig. 50 — Citirea reacției de aglutinare cu ajutorul oglinzii de microscop

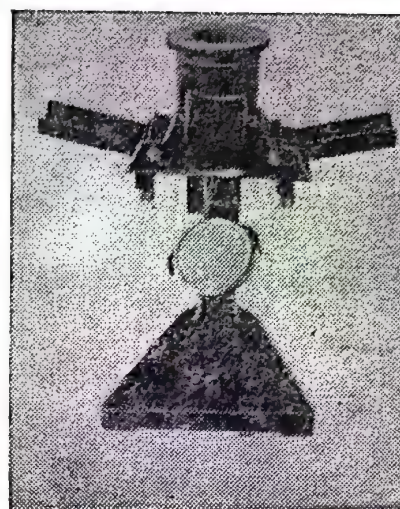


Fig. 51 — Aglutinoscop

constată că aglutinarea nu apare în toate tuburile seriei. Uneori aglutinarea nu apare în zona concentrațiilor mari de ser și este puternică în zona concentrațiilor mici. Lipsa aglutinării în zona tuburilor cu concentrații mari de ser a fost denumită fenomen de prezonă. Când lipsa aglutinării apare în zona concentrațiilor mici de ser, fenomenul este numit postzonă.

Mecanismul fenomenului nu este încă pe deplin elucidat. După unele cercetări el ar fi determinat de absorbția de către bacterii a unei globuline serice care învelind ca o peliculă bacteriile stânjenește acțiunea aglutinantă a anticorpilor specifici.

Reacția de seroaglutinare lentă este folosită și în diagnosticul tifopulurozei la păsări, al salmonelozelor la mamifere, în infecțiile colibacilare la mamifere și păsări, în bronșita infecțioasă la păsări, în micoplasmoza păsărilor etc.

D) *Aglutinarea pasivă sau indirectă* este o reacție antigen-anticorp, în care anticorpul aglutinează antigenul adsorbit pe diverse substraturi (colodiu, coloranți insolubili sau bacterii pentru unele virusuri). În ultimul timp, se folosesc frecvent globulele roșii aparținând diferitelor specii de animale (mai ales cele de pasăre). Principiul reacției constă, într-un prim timp, în adsorbția pe globulele roșii a antigenelor sau haptanelor și al doilea timp în aglutinarea globulelor port-antigen de către seruri imune.

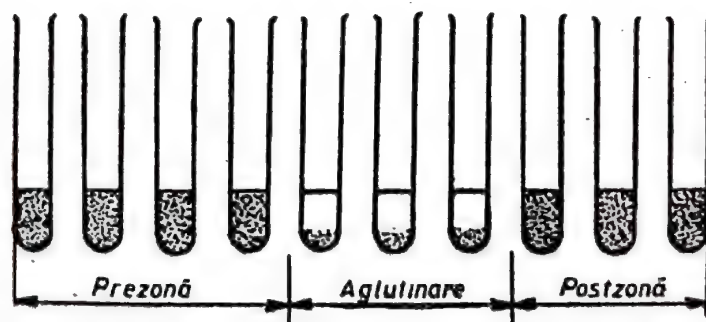


Fig. 52 — Fenomenul de zonă

S-a constatat că simplul contact cu globule roșii proaspete este suficient pentru fixare în cazul unor antigene polizaharidice, ca de pildă pentru *Haemophylus influenzae*, micobacterii, *Pasteurella tularensis*, *E. coli*, *Proteus*. Alte antigene însă, în special cele proteice, necesită în prealabil o tratare a globulelor roșii cu tanin, pentru ca adsorbția antigenului pe suprafața acestora să se poată face în bune condiții.

Această aglutinare poate fi inhibată de unele seruri, extracte de organe sau albumina de ou.

Adsorbția aglutininelor. Serurile aglutinante specifice se prepară prin inoculări repetate, la iepuri, de suspensii de germeni față de care se urmărește obținerea de anticorpi specifici. Structura bacteriilor este însă foarte complexă și deseori se întâmplă să existe fracțiuni antigenice comune mai multor specii. De exemplu, *Salmonella pullorum* conține antigeni notați convențional cu IX, XII, iar *Salmonella abortus ovis* antigenii IV și XII. Inoculându-se la iepure *S. pullorum*, în serul acestuia vor apărea anticorpi IX, XII. Datorită prezenței anticorpului XII serul care rezultă va aglutina atât *S. pullorum* cât și *S. abortus ovis*. El nu este deci specific.

Pentru a se obține un ser care să aglutineze numai *S. pullorum*, se recurge la adsorbția aglutininelor nespecifice (comune). În acest scop serul respectiv se pune în contact cu o suspensie de *S. abortus ovis*, care conține antigenii IV și XII. Amestecul se incubează la termostat timp de câteva ore, interval în care se produce cuplarea anticorp-antigen. Anticorpul XII va neutraliza ca urmare, antigenul XII. Prin centrifugare, cuplul format se depune, iar în supernatant vor rămâne numai anticorpii IX, serul devenind în acest fel aglutinant numai față de antigenul IX al *S. pullorum*.

E) **Lactoaglutinarea sau reacția inelară** este o metodă de diagnostic bazată pe decelarea anticorpilor specifici eliminați prin lapte. În cazul brucelozei, de exemplu, la animalele bolnave anticorpii trec și la nivelul secreției lactate, în cazul localizărilor mamare, ei atingând chiar titruri superioare serului sanguin. Antigenul brucelic, folosit în acest scop, este colorat (cu hematoxilină sau clorură de trifeniltetrazolium). Pentru reacție se recoltează din toate sferturile glandei mamare (preferabil la mijlocul mulsorii, pentru a asigura o concentrație medie de grăsime) câte 5—6 ml lapte, se face o probă de amestec și din aceasta se pune într-un tub de reacție cantitatea de 1 ml, peste care se adaugă o picătură de antigen colorat. Se omogenizează cu grija de a nu se produce spumă și se pune la termostat la 37°C timp de o oră (sau se lasă la temperatura camerei 3—4 ore), după care se face interpretarea reacției. În cazul în care în laptele de cercetat se găsesc anticorpi antibrucelici, se produce cuplul antigen anticorp, care prin modificarea încărcăturii sale electrice, va adera la particulele de grăsime din lapte și va fi antrenat spre suprafață, imprimând inelului de smântină ce se formează, culoarea antigenului. Reacția este pozitivă când inelul superficial este colorat intens și net, în timp ce restul lichidului se decolorează sau mai păstrează doar o ușoară nuanță de colorare. Se consideră că reacția este dubioasă, când inelul este mai colorat, iar coloana de lapte are aproximativ aceeași intensitate de culoare. Reacția este negativă, când inelul este alb sau foarte slab colorat, iar coloana de lapte este intens și uniform colorată. Nu se pretează pentru această reacție laptele colostrăl, laptele de la vaci cu afecțiuni mamare



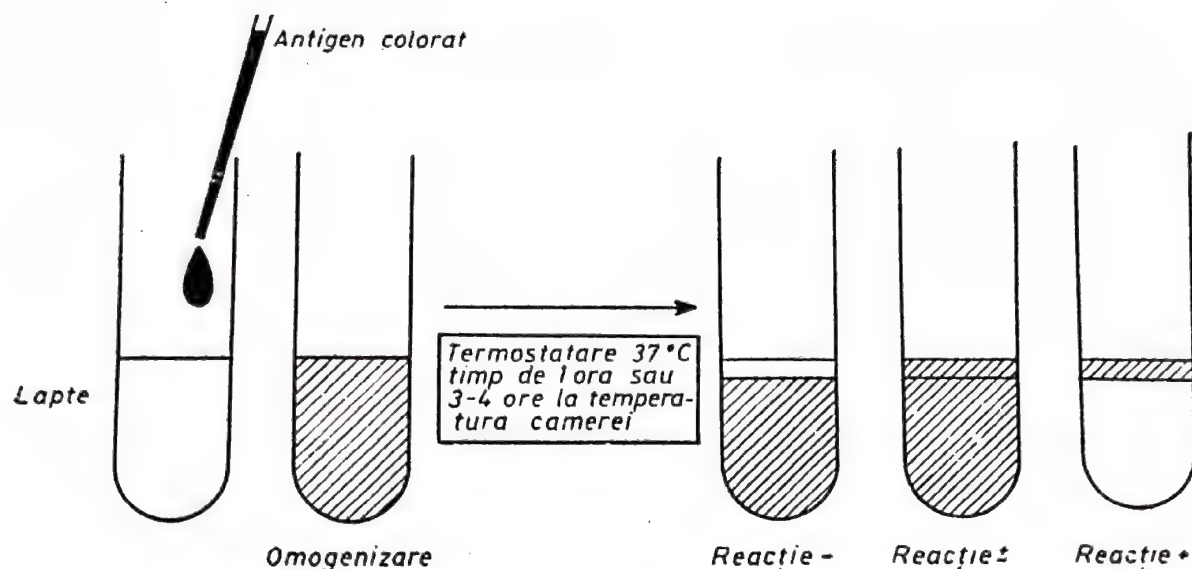


Fig. 53 — Schema reacției inelare de lactoaglutinare

laptele vechi cu un grad de acidifiere și laptele fiert. Rezultatele acestei metode nu concordă întotdeauna cu cele furnizate de RAL și RFC.

F) *Mucoaglutinarea* folosește ca sursă de anticorpi diferite mucozități (secreții genitale, nazale, oculare) ce se pun în contact cu antigenul adecvat. Aceste secreții se recoltează cu pipete sterile sau cu tampoane de vată și se diluează cu ser fiziologic steril, după care se lasă 24 de ore la 37°C pentru extracție. Apoi se pun în contact cu antigenul, întocmai ca la seroaglutinarea lentă. Reacția se poate practica în bruceloza sau vibrioză genitală a taurinelor, având însă mai mult o valoare orientativă.

G) *Reacția de microaglutinare-liză (RMAL)* este o metodă consacrată pentru diagnosticul infecției leptospirice. Ea se bazează pe punerea în contact a leptospirelor vii, cultivate pe mediu lichid (Korthoff), cu serul suspect. În prezența anticorpilor specifici antileptospirici se produce aglutinarea leptospirelor și, în final, liza acestora, fenomen vizibil prin examinare la microscop în câmp întunecat. Metoda are avantajul că odată cu precizarea diagnosticului se poate stabili și tipul de leptospiră în cauză. În acest scop se folosesc tulpinile de leptospire mai frecvent izolate de la animale (*L. ichtero-hemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*, *grippotiphosa*, *mitis*, *wolfii*, *sejroe*, *hebdomadis* etc.). Culturile ce se folosesc pentru această reacție trebuie să fie tinere de 5—12 zile și să conțină un număr suficient de leptospire pe unitatea de volum (50—300 leptospire pe cm², la obiectivul 20, ocular 15). Înainte de executarea reacției, tulpinile se verifică sub raportul aglutinabilității spontane (cu ser fiziologic) și specifice (cu ser specific). Reacția se execută pe lame de microscop bine degresate, pe care se pun atâtea picături din serul de cercetat (în diluții superioare celei de 1/50), câte serotipuri de leptospire se folosesc. La fiecare picătură de ser se adaugă o picătură de cultură de leptospire din fiecare tip. În felul acesta, diluția serului pe lamă se dublează. Se omogenizează bine cu ansa flambată după fiecare picătură, se lasă în contact timp de 15 minute și se examinează la microscopul cu câmp întunecat.

Aglutinarea se manifestă prin îngrămădirea leptospirelor în ghome cu aspect stelat, mobile datorită extremităților libere ce continuă să se

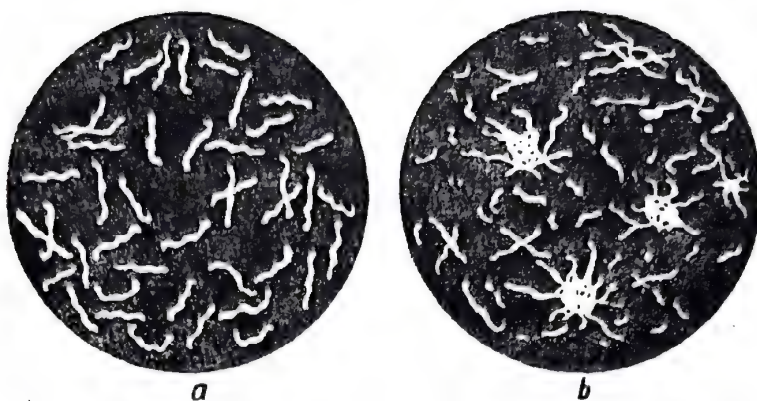


Fig. 54 — Reacția de microaglutinare-liză
a — reacție negativă; b — reacție pozitivă

miște. Fenomenul este urmat de imobilizarea treptată a leptospirelor, de ștergerea conturului și de apariția aspectului granular al leptospirelor, mergînd pînă la dezagregarea completă, cu dispariția totală a leptospirelor din cîmpul microscopic.

În funcție de concentrația anticorpilor în sîngele de cercetat, rapiditatea cu care se instalează aglutinarea și respectiv liza, precum și intensitatea lor, reacția apare vizibilă în mod variabil. La o concentrație ridicată a anticorpilor se poate produce direct liza leptospirelor.

Interpretarea reacției se face astfel:

- 1 — se notează cu L liza totală a leptospirelor;
- 2 — reacția intens pozitivă ++++ cînd aglutinarea este masivă constînd în gheme, fără leptospire libere;
- 3 — reacția pozitivă +++ și ++ cînd predomină ghemurile, dar se văd și leptospire libere;
- 4 — reacția slab pozitivă + se observă 4—5 gheme pe cîmp, dar predomină leptospirele libere;
- 5 — reacția negativă cînd nu există leptospire aglutinate.

Titrul de diagnostic pentru RMAL este considerat pozitiv la diluția de 1/800 pentru cabaline și de 1/400 pentru celelalte specii.

Reacția de aglutinare-liză se poate efectua și în tuburi, însă metoda este mai greoaie și nu a luat extindere.

H) *Reacția de fixare a complementului (RFC)* se folosește atît în diagnosticul unor bacterioze, cît și al unor viroze și a fost concepută ca urmare a constatării că cuplarea anticorpilor cu antigenele, datorită naturii antigenului, nu se manifestă întotdeauna într-o formă vizibilă sau, chiar dacă se manifestă, datele furnizate de RFC în asemenea cazuri sînt mai concludente. Apoi există o serie de specii bacteriene care, în forma lor virulentă, se prezintă sub formă de colonii de tip R, care aglutinează spontan și deci nu pot fi folosite pentru reacțiile de aglutinare.

Principiul reacției se bazează pe constatarea că ori de cîte ori combinarea antigenului cu anticorpul specific se petrece în prezența alexinei (complementului), aceasta se fixează pe complexul format. În consecință, dacă se pune în evidență fixarea complementului, se dovedește dispariția lui din amestec ca entitate liberă și, indirect, combinarea antigenului cu anticorpul specific. Dar, pentru a face vizibil acest lucru, se recurge la un artificiu de tehnică serologică, care constă în introducerea în reacție a

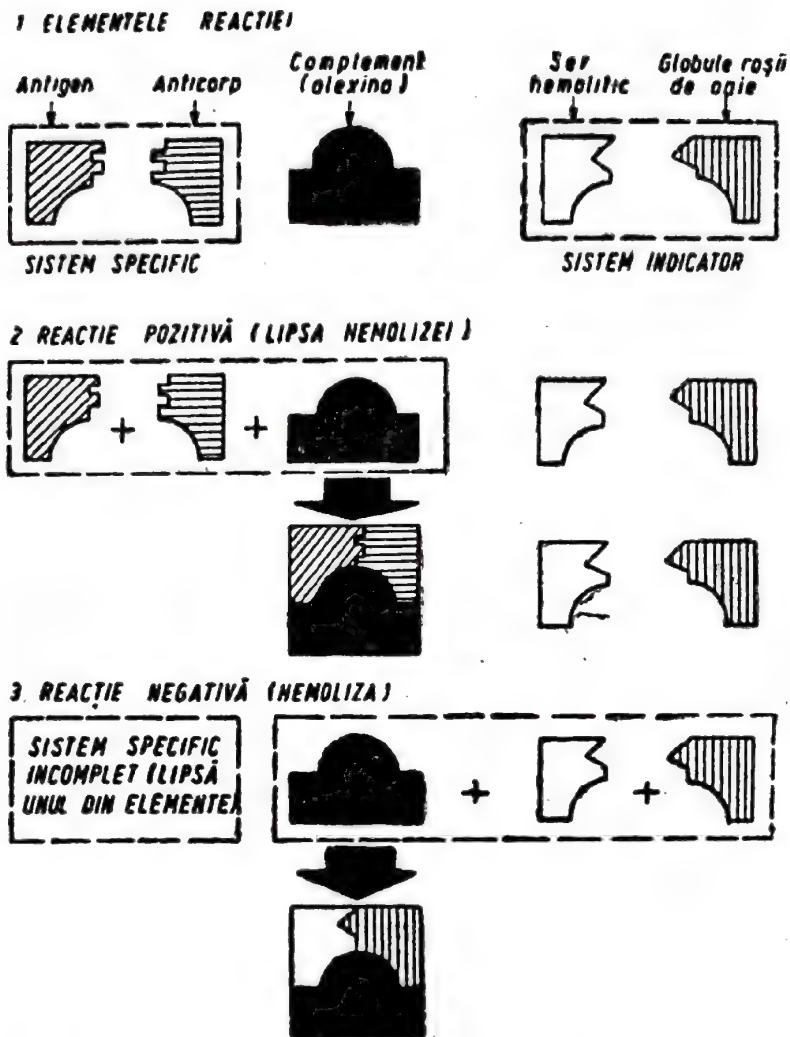


Fig. 55 — Schema reacției de fixare a complementului

unui al doilea sistem antigen-anticorp, cu rol de sistem indicator. Acest sistem este reprezentat de globulele roșii de oaie și de serul hemolitic antioaie.

În prezența alexinei, hematiile de oaie combinate cu anticorpii antioaie prezintă o modificare vizibilă — hemoliza. În absența alexinei, hematiile, deși amestecate cu serul hemolitic, rămân nehemolizate.

Schematic, elementele RFC sînt următoarele:

1 — *antigenul* — o suspensie microbiană, virală sau un antigen solubil (extracte microbiene, tisulare);

2 — *anticorpul* — reprezentat de serul provenit de la animalul bolnav, trecut prin boală sau imunizat artificial;

3 — *alexina* (complementul) — reprezentat de serul proaspăt de cobai; el poate fi livrat și în stare liofilizată, urmînd a fi diluat ex tempore;

4 — *suspensia de hematii de oaie*. Pentru a obține o suspensie de 1,25% hematii se recoltează sînge de oaie, într-un balon cu perle de sticlă, steril, pentru defibrinare; centrifugarea, la 2000 turații/minut timp de 15 minute, este urmată de resuspendarea hematiilor în ser fiziologic steril, de omogenizare și centrifugare; după 3 asemenea spălări se pre-

pară suspensia, în proporție de 1,25 ml la 100 ml ser fiziologic, care se folosește în reacție;

5 — *serul hemolitic antihematii de oaie* care se diluează în prealabil la titrul indicat de etichetă; el se prepară pe iepure prin inoculări repetate de suspensii de hematii de oaie.

Reacția fiind foarte sensibilă, elementele ei trebuie, în prealabil, titrate (antigen, alexină, ser hemolitic) pentru a folosi cantități bine determinate. Este de asemenea necesar să se folosească o serie de martori care să permită controlul reacției și să evite greșelile de interpretare datorită alterării accidentale a unuia din elemente (martor pozitiv, martor negativ, martor pentru stabilirea valorii anticomplementare a serului de cercetat, a antigenului).

RFC se folosește în mod curent pentru diagnosticul morvei, durinei, brucelozei, infecțiilor rickettsiene, chlamidiene, paratuberculozei, epididimitei infecțioase a berbecilor etc.

Spre exemplificare este dată tehnica RFC în cazul brucelozei.

Elementele reacției. Antigenul folosit în RFC este același ca și cel de la tehnica RAL, cu titrul pentru RFC indicat în prospectul însoțitor sau care rezultă la titrarea în laborator. Dacă se consideră necesar, se poate face o retitrare a antigenului la fiecare serie nou-primită în laborator.

Serurile de examinat trebuie să fie limpezi; se pot admite ușoare urme de hemoliză.

Serul fiziologic este o soluție de clorură de sodiu chimic pură 8,5‰ preparată în apă distilată. Toate operațiunile din aceeași zi se vor efectua cu o singură serie de ser fiziologic.

Alexina de lucru este cea livrată de ICVB „Pasteur” sau proaspăt recoltată de la cobai. Hematiile pentru sistemul hemolitic se recoltează de la berbec și se pregătesc prin centrifugare și spălare de 3—4 ori cu ser fiziologic astfel ca la ultima centrifugare supernatantul să rămână complet limpede.

Serul hemolitic se procură de la ICVB „Pasteur” și se folosește conform instrucțiunilor și la titrul specificat pe eticheta fiolei sau determinat prin titrare.

Executarea reacției. Serul de examinat se distribuie în eprubete de 100/12 mm, în cantitate de 0,1 ml, la care se adaugă 0,4 ml ser fiziologic. Stativele se agită și se trec la baia de inactivare de + 56°C unde se țin 30 de minute. După inactivare se adaugă în fiecare eprubetă antigenul în doza de lucru stabilită prin titrul dat de biofabrică sau retitrarea de laborator, care se aduce la volumul de 0,5 ml ser fiziologic. Se agită. Se adaugă apoi alexina în doza stabilită prin titrare, de asemenea întregită la volumul de 0,5 ml de probă. Se agită. Stativele se introduc în baia de 37°C unde se țin 30 de minute. Se scot de la baie și se adaugă câte 1 ml din sistemul hemolitic, în fiecare eprubetă. Se agită. Se reintroduc la baie de 37°C timp de 15 minute după care se citește imediat rezultatul.

Pentru controlul reacției și al calității elementelor, concomitent se vor introduce și martori de ser pozitiv și ser negativ.

Citirea constă în aprecierea gradului de hemoliză, notându-se astfel:

1 — reacție intens pozitivă (++++), exprimată prin reținerea totală a hemolizei;

2 — reacție pozitivă (+++), exprimată prin reținerea aproape totală a hemolizei;

3 — reacție dubioasă (+ +), hemoliză parțială, 50%;

4 — reacție dubioasă (+), hemoliză aproape completă;

5 — reacție negativă (—), hemoliză totală.

Interpretarea reacției. Se consideră pozitive probele notate cu +++ și ++++.

Se consideră dubioase probele notate cu + și ++.

Se consideră negative probele notate cu —.

Toate probele dubioase și pozitive se vor reexamina cu aceeași tehnică dar și în prezența matorului de probă (fără antigen), dacă aceasta nu s-a făcut la primul examen.

Titrare elementelor de reacție. *Titrare antigenului* se face după schema arătată în tabelul 4, în scopul stabilirii valorii fixatorii și a puterii anticomplementare.

Tabelul 4

Titrare antigenului pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mar- tor sist. hem. cu alex.	Mar- tor sist. fără alex.
Ser pozitiv	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
Ser fiziologic	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4		

Inactivare 30 minute la +56°C

Antigen din flac. dil. 1/50	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1		
Alexină (titr. stab.) adus la volum	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Ser fiziologic	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0	1	1,5

Se trece la baia de 37°C 30 de minute

Sistem hemoli- tic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

15 minute la 37°C

Pentru stabilirea puterii anticomplementare a antigenului se va executa aceeași reacție înlocuind serul pozitiv cu serul negativ.

Valoarea fixatorie a antigenului este dată de eprubeta care conține cantitatea minimă de antigen ce fixează de ++++, și care față de serul negativ s-a dovedit fără putere anticomplementară.

Titrare alexinei se face în prezența tuturor elementelor ce intră în reacție (tabelul 5).

Tabelul 5

Titrarea alexinei pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mart. sist. hem.
Ser negativ de specie	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Ser fiziologic	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	

Inactivare la +56°C timp de 30 minute

Alexină diluată 1/10	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	—
Antigen în doză de lucru	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Ser fiziologic	0,40	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	1,5

Se trece la baia de 37°C timp de 30 minute

Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Baie de 37°C timp de 15 minute

Citirea reacției

Titulul este dat de eprubeta în care s-a obținut hemoliza totală cu cea mai mică doză de alexină și reprezintă doza de lucru în reacția ce se face la probele de examinat.

Alexina liofilizată se folosește pentru lucru astfel:

Se estimează aproximativ numărul de fiole necesare pentru probele din ziua respectivă. Se suspensionează conținutul fiecărei fiole cu 1 ml de apă distilată, al căror volum apoi se comasează și se omogenizează. Din acesta se constituie pentru titrare o suspensie inițială de 1 : 10 în ser fiziologic, pornindu-se cu 0,1 ml și în volume crescînde cu pasul de 0,02 ml (ca în exemplul din tabelul 5).

Pentru alexina proaspăt recoltată de la cobai întreținuți corespunzător, suspensia de titrare va fi de 1 : 20, cu pasul de 0,03 ml.

Numărul de eprubete din scară, mărimea pasului (0,03 ml; 0,02 ml; 0,01 ml) și suspensia inițială (1 : 20; 1 : 10) se apreciază în funcție de calitatea alexinei din titrările anterioare. Serul de specie, ce se folosește în titrarea alexinei, se obține din amestecul unui număr de 5—10 seruri negative proaspete, păstrat la frigider spre utilizare 3—4 zile.

Titrarea serului hemolitic se face după următoarea schemă arătată în tabelul 6.

Titrare serului hemolitic pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ser hemol. în dil.	1/100 1	1/500 1	1/1000 1	1/1500 1	1/2000 1	1/2500 1	1/3000 1	1/3500 1	1/4000 1
Hem. oaie susp. 2,5%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser fiz.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

La baie de 37°C timp de 30 minute

Alexină dil. 1/10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
-------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

La baie de 37°C timp de 15 minute

Citirea rezultatelor

Titul serului hemolitic este indicat de diluția maximă la care se obține hemoliza totală.

La prepararea sistemului hemolitic pentru reacție se va folosi de 4 ori cantitatea stabilită la titrare (4 unități hemolitice).

Sistemul hemolitic. Se prepară dintr-o suspensie de hematii de berbec spălate prin centrifugare. Volumul de ser fiziologic necesar pentru sistemul hemolitic se împarte în două părți egale. Se calculează cantitatea de ser hemolitic necesară, care se adaugă la una din părți. La cealaltă se adaugă hematiile spălate, calculate 1,25% pentru întreaga cantitate de sistem.

După agitare se amestecă cele două părți.

Se agită din nou și apoi se introduce la baie la 37°C, timp de 30 minute, păstrându-se apoi la frigider pînă la folosire.

În aplicarea RFC, trebuie să se țină seama de un fenomen adesea întîlnit — anticomplementaritatea pe care o posedă unele antigene sau seruri. Prin anticomplementaritate sau putere anticomplementară se înțelege proprietatea pe care o au acestea, de a fixa alexina, în absența cuplului antigen-anticorp. Acest inconvenient poate fi înlăturat uneori prin diluare sau prin tratare prealabilă cu diferite substanțe chimice. Astfel antigenele pot fi tratate cu eter, cloroform, acetonă, sau pot fi congelate repetat.

Antigenele sau serurile cu proprietăți anticomplementare, împiedicînd hemoliza la un titru egal sau apropiat de titrul fixator, nu pot fi întrebuintate în reacție. Pentru a titra puterea anticomplementară, se execută reacția în aceleași condiții, cu singura deosebire că serul pozitiv se înlocuiește cu diluant.

RFC se mai poate efectua și după alte tehnici. Una din acestea este și RFC la rece. În aceasta, fixarea alexinei pe sistemul antigen-anticorp are loc la +4°C. În aceste condiții pentru fixarea alexinei este nevoie de un timp mai îndelungat (18 ore). Metoda s-a dovedit a fi mai sensibilă.

în decelarea anticorpilor fixatori în cazul unor infecții bacteriene, cum este tuberculoza, sau în bolile virale.

RFC indirectă, sau reacția de inhibare a fixării complementului, se practică pentru serurile unor specii de păsări (găini, rațe) în care apar, în cazul unor infecții, anticorpi capabili să inhibe fixarea alexinei pe complexul antigen-anticorp. În acest caz se adaugă în reacție un ser cunoscut pozitiv care, împreună cu antigenul, fixează alexina (ser indicator), dar care, în prezența anticorpilor inhibitori este neutralizat, antigenul rămânând liber. Alexina fiind fixată pe sistemul hemolitic are loc hemoliza, deci existența acesteia indică o reacție pozitivă.

Dacă în serul examinat nu există anticorpi inhibitori, serul indicator se fixează pe antigen formând cuplul specific, care fixează alexina și, ca urmare, hemoliza nu se mai produce. Absența hemolizei în acest caz indică o reacție negativă.

1) *Reacția de aglutinare*. Principiul reacției a fost enunțat încă în 1906 de către BORDET, care a arătat existența în serul bovinelor a unui factor termostabil la 56°C capabil de a aglomera hematiile în prezența alexinei libere. Ea are avantajul că este mai sensibilă decât reacția de fixare a complementului.

Elementele reacției sînt:

- alexină de cal (ser, eventual liofilizat);
- conglutina (ser de bovine adulte, inactivat 30 de minute la 56°C; conservarea se face în stare congelată la -30°C);
- globule roșii de oaie (suspensie de hematii spălate de 4 ori în soluție fiziologică tamponată, la concentrație finală de 0,5%);
- reactivi specifici (serul de cercetat și suspensia de antigen corespunzătoare);
- probele martor (ser pozitiv și suspensia antigenică).

Reacția se poate desfășura în tuburi sau în plăci de material plastic (în cazul aplicării micrometodei). În cele ce urmează va fi descrisă micrometoda pentru diagnosticul mixomatozei iepurilor.

1 — *Prepararea serurilor de referință* se face pe iepuri adulți, prealabil controlați serologic și reacționați negativ. Virusurile mixomatozei

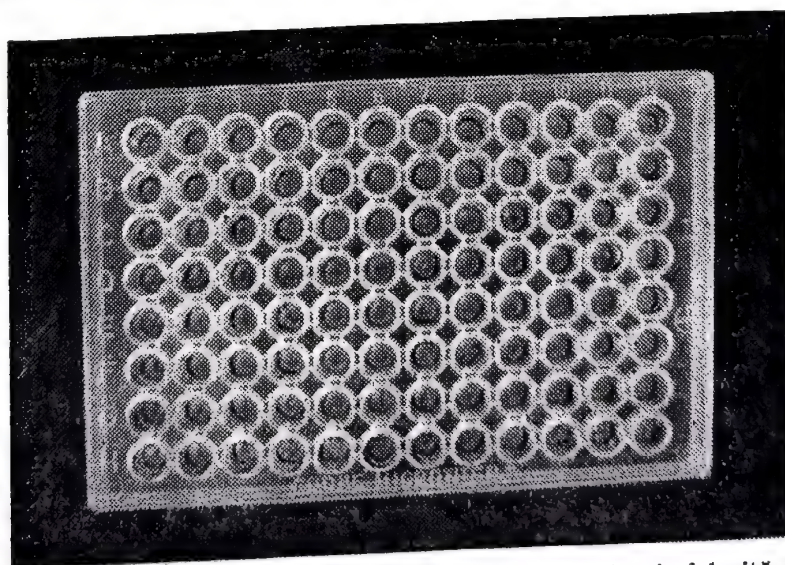


Fig. 56 — Placă de material plastic cu godeuri folosită în micrореacții serologice

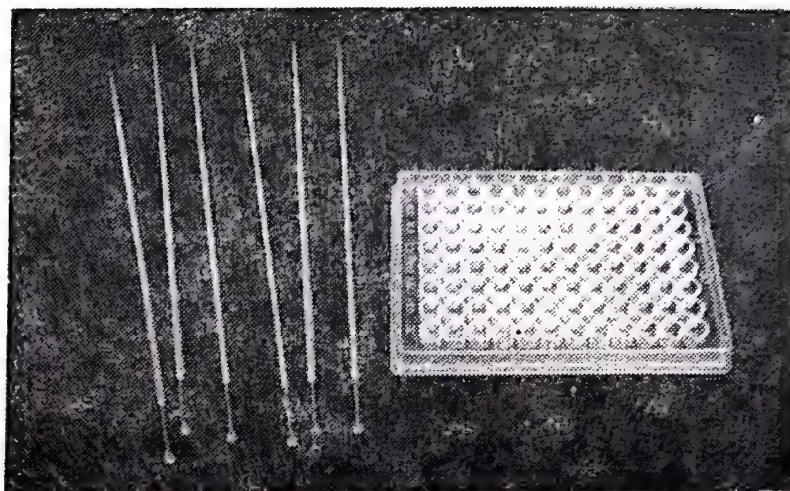


Fig. 57 — Placă cu godeuri și omogenizatoare folosite la microreacții serologice

și ale fibromatozei folosite pentru inocularea iepurilor donatori de ser pozitiv sînt extrase din mixoame și fibroame dezvoltate la iepuri după inocularea intradermică a acestor virusuri.

a) Serul antimixomatos. Mai mulți iepuri sînt inoculați mai întîi pe cale subcutanată cu virusul fibromatozei (vaccinare), iar după 2—3 săptămîni sînt inoculați de probă cu virusul mixomatozei. În cursul acestei probe, fiecare animal vaccinat, ca și martorii, primesc pe cale intradermică 10^3DL_{50} din virusul mixomatozei, doză care omoară invariabil martorii în decurs de 10 zile. După 3 săptămîni, iepurii inoculați sînt hiperimunizați prin 3—4 reprize, la intervale de 1 săptămînă, cu cca 10^8DL_{50} de virus al mixomatozei, inoculat pe cale subcutanată sau intradermică, în mai multe puncte diferite ale suprafeței cutanate. La o săptămînă după ultima inoculare, sîngele este prelevat prin puncție cardiacă, după o prealabilă dietă absolută de 24 de ore.

b) Serul antifibromatos. Ca și în cazul precedent, iepurii primesc mai întîi virus fibromatos pe cale intradermică. După 20—30 de zile, cînd fibromul inițial a regresat vizibil, sau a dispărut, acești iepuri sînt reînoculați în 3 reprize, la un interval de o săptămînă, cu 10^9DL_{50} de virus fibromatos injectat pe cale intradermică în mai multe puncte.

Sîngele iepurilor este prelevat la o săptămînă de la ultima inoculare, prin puncție cardiacă.

Probele de ser, recoltate de la iepuri astfel hiperimunizați, sînt decantate, după coagularea sîngelui, centrifugate și repartizate în fiole sau eprubete, în cantități reduse, pentru a nu fi necesare congelarea și decongelarea repetată. Serurile se conservă la -30°C și, în momentul folosirii, se inactivează 30 de minute la 56°C .

2 — *Prepararea antigenului* se poate realiza din mixoame și respectiv fibroame cutanate, dezvoltate la iepuri inoculați experimental sau din culturi celulare renale de iepuri, inoculate cu aceleași virusuri. Această din urmă soluție este mai convenabilă din toate punctele de vedere. Antigenul este reprezentat de lichidul de cultură și monostratul celular inoculat, recoltate la 6—7 zile de la inocularea cu doze de 10^{-3} virus.

Păstrarea se face la -70°C după repartizarea în fiole sau eprubete, în cantități mici, pentru a evita decongelările și congelările repetate.

În momentul utilizării, suspensia se decongelează și se filtrează prin filtru millipore.

3 — *Titrarea conglutininei și a alexinei* are menirea de a determina concentrația cea mai slabă de conglutinine și alexină, capabile de a provoca un efect conglutinant total (1 unitate conglutinantă). Titrarea se face printr-o reacție de conglutinare încrucișată pentru fiecare șarjă de conglutinine și alexină. În acest scop, se pune în contact serul de bovine adulte inactivat în diluții crescînde (0,025 ml) cu globulele roșii de oaie stabilizate 0,5% (0,05 ml) și cu alexina (0,025 ml) în diluții crescînde. De exemplu, dacă se alege concentrația de conglutinine cu care să se lucreze, la 8,75%, diluția de alexină corespunzătoare, în care se produce un efect conglutinant total este de 1/64, ceea ce reprezintă, în cazul de față, o unitate conglutinantă.

În reacția propriu-zisă se vor folosi întotdeauna 2 unități conglutinante. În exemplul de mai sus, alexina va fi deci utilizată în concentrația de 1/32.

4 — *Titrarea antigenului și anticorpilor*. Diluțiile de lucru ale reactivilor generali (conglutininele și alexina) fiind determinate, se recurge la titrarea antigenului și anticorpilor. Se pun în contact cantități constante din antigen (virus mixomatos) în diluții crescînde, cu aceleași cantități de anticorpi (ser de iepuri hiperimunizați) de asemenea în diluții, plus suspensii de hematii de oaie 0,5% și, după 30 de minute de incubare la 37°C, reacția se interpretează prin aprecierea gradului de conglutinare.

Desfășurarea reacției propriu-zise are loc după schema arătată în tabelul 7.

Tabelul 7

Desfășurarea reacției de conglutinare

Elementele reacției	Diluția		Martor ser		Martori generali	
	1/10	1/20	1/10	1/20	Antigen	Alexină
Ser suspect	0,025	0,025	0,025	0,025	0	0
Antigen în concentrație optimă	0,025	0,025	0	0	0,025	0
Soluție tampon	0	0	0,025	0,025	0,025	0,025
Alexină titrată	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

30 minute la 37°C

2 — Conglutinarea

Volum de globule roșii de oaie și conglutinină titrată	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
--	------	------	------	------	------	------

30 minute la 37°C

3 — Centrifugarea la 500 turații/minut timp de 15 minute

J) *Reacțiile de precipitare* se folosesc atunci cînd antigenul este reprezentat de soluții coloidale (antigen molecular), formate din particule foarte fine, care, sub acțiunea anticorpilor, (precipitinelor) ies din soluție sub forma unui precipitat. Ele sînt rezultatul acțiunii anticorpilor specifici dintr-un ser imun (în prezența electroliților) asupra substanței precipitabile (antigenul). Fenomenul precipitării se aseamănă, în linii mari, cu acela al aglutinării, pentru că în ambele se produce o îngrămadire sub formă de flocoane a particulelor răspîndite în soluția de electrolit cu amestec de antigen-anticorp. Aceste reacții au o mare sensibilitate și pot pune în evidență cantități infime de antigen prezent în soluție (cu seruri imune de calitate bună se pot decela antigene în diluție de chiar 1/1 milion). Aceasta se recomandă și pentru identificarea diverselor proteine animale, în decelarea unor adaosuri de natură proteică la produsele alimentare. Se folosește însă curent și pentru identificarea unor antigene bacteriene, cum ar fi cele ale *B. anthracis*, ale streptococilor.

Dintre tehnicile de evidențiere a reacției de precipitare, în practică se folosesc mai ales cîteva:

a) *Precipitarea în disc* în care lichidele conținînd anticorpii și antigenul sînt puse în contact de așa manieră încît, să nu se amestece, iar la nivelul de separare a lor să apară un disc de precipitare, vizibil ca un strat albicios, ce contrastează cu ambele lichide. Procedul stă la baza diagnosticului serologic al antraxului prin tehnica cunoscută sub denumirea de reacția Ascoli. Elementele reacției sînt:

— *antigenul* (precipitinogenul). Se taie cît mai mărunt fragmente de organe suspecte, de preferință din splină și se suspendă în soluție fiziologică în proporție de 1/3. Se fierb timp de 10 minute în baia de apă și se filtrează prin vată de azbest. Filtratul obținut este un lichid perfect limpede, de culoare ușor gălbuie, reprezentînd precipitinogenul. În ultimul timp, se folosește extracția precipitinogenului la rece, în soluție fiziologică fenolată 0,5‰;

— *serul anticarbonos precipitant* se prepară pe cabaline prin hiperimunizarea acestora cu cultură de *B. anthracis* administrată intravenos. Conține anticorpi precipitanți somatici și capsulari.

Tehnica de lucru. Într-un tub de reacție se introduc 0,5—1 ml extract de organe filtrat precipitinogen, antigen perfect limpede. Cu o pipetă Pasteur bine efilată se adaugă la fundul tubului o cantitate egală de ser anticarbonos precipitant în așa fel ca cele două lichide să nu se amestece. Serul precipitant rămîne la fundul tubului, în timp ce extractul de organe se ridică la suprafață.

Reacția este pozitivă cînd la zona de contact dintre cele două lichide apare imediat sau în decurs de 2—3 minute un disc de culoare albă-cenușie.

În cazul efectuării reacției Ascoli din piei de la cadavre suspecte de antrax, extracția precipitinogenului se face de regulă prin macerare. Pielea se taie în fragmente mici, care se pun la macerat în soluție fiziologică fenolată 5‰ timp de 24 de ore, după care se filtrează și se execută reacția în același mod (reacția Ascoli la rece). Trebuie precizat că sărarea pieilor împiedică punerea diagnosticului prin această metodă.

b) *Precipitarea în amestec sau flocularea.* În acest caz, în amestecul dintre serul conținînd anticorpi și antigen, reacția apare inițial sub

forma unei ușoare opalescențe, care apoi se accentuează, apărând vizibil ca niște flocoane mari, care sedimentează.

Această reacție este folosită pentru titrarea unor toxine bacteriene sau a unor seruri antitoxice (antitoxine). Viteza de producere a reacției depinde direct de raportul dintre antigen și anticorp în sensul că are loc cu atât mai repede cu cât concentrația de anticorpi din ser este mai corespunzătoare cantitativ antigenului. Un exces, fie din partea antigenului fie a anticorpilor, provoacă o întârziere a reacției, care este cu atât mai mare cu cât disproporția este mai mare. Pe baza acestui principiu, se poate determina fie titrul serurilor antitoxice, folosind ca antigen o toxină cu titrul cunoscut, fie titrul unei toxine cu ajutorul unui ser antitoxic cu titru cunoscut.

Elementul cunoscut, de exemplu toxina, se repartizează în mai multe tuburi de reacție în cantitate constantă (1—2 ml), după care se adaugă același volum din diluții crescînde ale elementului necunoscut (în cazul de față serul antitoxic): $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$ etc. Tuburile se agită și se lasă apoi în repaus urmărindu-se timpul de apariție a floculării. Se notează tubul în care reacția apare mai întâi, acesta reprezentînd diluția în care numărul de unități antitoxice corespunde numărului de unități toxice din volumul de toxină repartizat inițial în toate tuburile.

c) *Precipitarea în gel sau agar* este o metodă care, datorită fineței și preciziei rezultatelor ce le oferă, este azi larg folosită în laboratoare, în special în determinările legate de structura antigenică a microorganismelor, ca și în alte determinări de imunologie, imunochimie. Prin difuziunea lentă a soluțiilor de antigen și anticorp în agar, acrylamidă sau gelatină, se creează linii de precipitare vizibile, care permit stabilirea exactă a particularităților antigenice, ale diferitelor produse biologice sau a capacității precipitante a unor seruri. Metoda a fost inițiată de ELEK (1948) și OUCHTERLONY (1949).

Pentru a efectua asemenea reacții se procedează la turnarea pe plăci de sticlă dimensionate după dorință, în plăci Petri sau în plăci din mate-

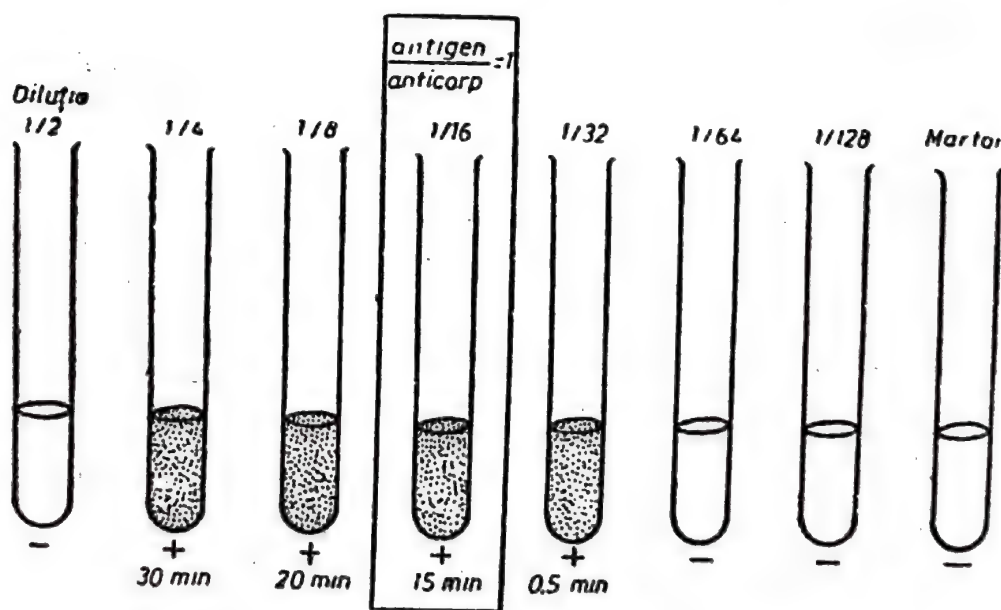


Fig. 58 — Schema reacției de serofloculare (după Valeria Bica Popii)

rial plastic, a unui strat de agar purificat 2,5—3‰ în soluție tamponată și mertiolată 1/10 000. Este necesar ca plăcile să aibă o poziție perfect orizontală (fapt realizabil cu ajutorul unei bule de nivel). Agarul topit se toarnă în cantitate suficientă, pentru ca stratul să aibă o grosime de 2,5—3 mm. După solidificare, pe acest strat se așază câte o matriță, avînd forme și mărimi variabile (pentru godeuri rotunde sau pătrate, situate la distanțe variabile, de circa 6—12 mm), în funcție de tipul antigenului și de titrul serului folosit. Odată matrița așezată pe stratul de agar solidificat, se toarnă un nou strat de agar topit, după a cărui solidificare, prin ridicarea matriței, vor rezulta godeuri în care se vor pune componentele reacției. Cel mai frecvent, se folosește modalitatea de a amplasa în jurul unui godeu central godeuri de aceleași dimensiuni. Folosirea lor poate fi variabilă. Se poate pune central un ser cunoscut și în godeurile din jur antigene necunoscute, se poate pune central un antigen cunoscut și în jur seruri necunoscute, se poate pune central un ser necunoscut și în jur antigene cunoscute și invers. Indiferent de soluția practică, se pun în godeurile respective serurile și respectiv antigenele care intră în reacție (cîte 1 sau 2 picături în diluții corespunzătoare), și plăcile se lasă la temperatura camerei. Eventual pe partea internă a capacului plăcii se pune o hîrtie de filtru îmbibată cu apă distilată, care întreține o umiditate corespunzătoare pînă la citirea reacției sau se realizează o cameră umedă special destinată acestui scop. În general, citirea se face din două în două zile, cea definitivă fiind în cea de a 6-a zi. În cazul că există antigene corespunzătoare anticorpilor din serurile folosite, între godeurile respective, la distanțe variabile, se formează linii de precipitare albe-cenușii, vizibile cu ochiul liber. Lungimea și grosimea lor este în funcție de titrul anticorpilor din ser și de calitatea mediului folosit. Aceste linii pot fi apoi colorate (cu amidoschwarz, sau cu alți coloranți preparați după formule diferite), după prealabila deshidratare a stratului de agar cu ajutorul hîrtiei de filtru. Spre exemplificare este dat *testul Coggins*

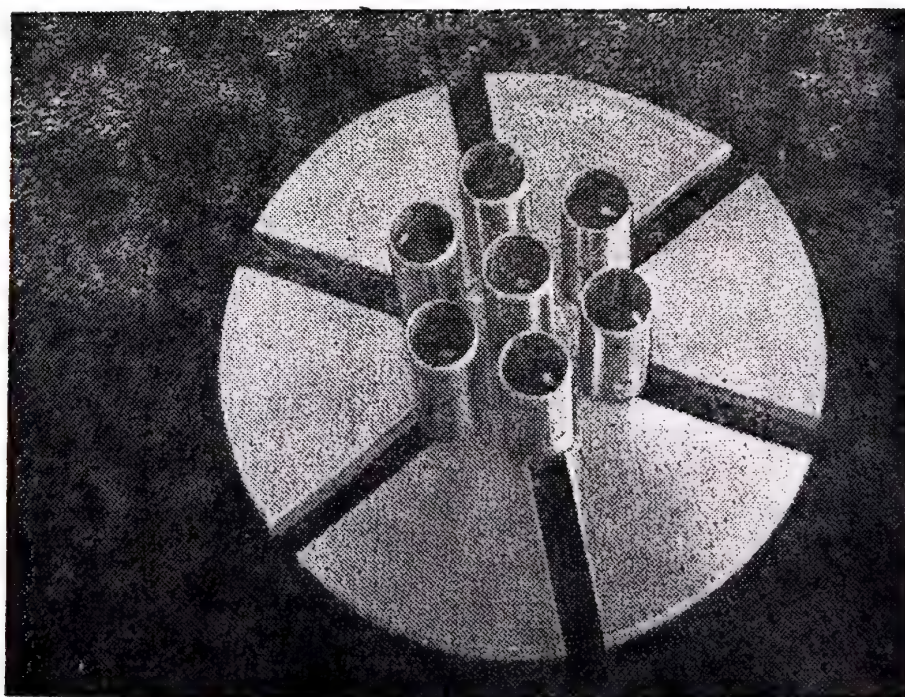


Fig. 59 — Dispozitiv reglabil original folosit pentru efectuarea godeurilor în agarul destinat reacțiilor de imunodifuziune în gel

de imunodifuziune în gel de agar pentru diagnosticul anemiei infecțioase a calului. Este la ora actuală, în afară de inocularea experimentală și izolarea virusului pe culturi celulare, singura metodă specifică. Ea are avantajul că se poate practica în timpul vieții animalului, că descoperă animalele anemolatente sau cu forme insuficient exprimate clinic. Nu dă rezultate înainte de formarea anticorpilor specifici (10—14 zile de la debut) sau în faza negativă imunologică.

Pentru efectuarea reacției se folosește un mediu cu agar în soluție de tampon borat preparat astfel:

- NaOH — 2 g
- acid boric (H_3BO_3) — 9 g
- apă distilată — 1000 g

Ingredientele trebuie să fie de cea mai mare puritate, soluția trebuie să aibă în final un pH de 8,6 (măsurat la pH-metru de precizie). Din aceasta se prepară apoi agar de două concentrații, care determină densități diferite: 1,5% și 0,7%, folosindu-se Agar Noble Difco sau Special Agar Noble Difco. Calitatea agarului este de asemenea de o extremă importanță pentru reușita reacției.

Agarul se toarnă în două straturi, în plăci de material plastic (pot fi folosite cutii pentru polivitamine sau alte drajeuri aflate în comerț, cu condiția să nu fie zgîriate și să fie cât mai transparente), în așa fel ca primul strat să aibă o grosime de cca 2 mm (2—2,5 ml agar 1,5%) iar al doilea de 3—3,5 mm (6,5 ml agar de concentrație 0,7%). Plăcile respective, spălate și uscate, se așază în prealabil pe o suprafață plană, orizontalizată cu ajutorul unei bule de nivel. Repartizarea agarului topit se face cu ajutorul unor pipete curate. Se lasă să se solidifice primul strat de agar (cca 20—30 minute) după care se toarnă cel de al doilea strat și se lasă să se solidifice. Apoi, cu ajutorul unei preducele avînd diametrul de 7 mm și al unui șablon de material plastic sau ebonită, avînd orificii corespunzătoare godeurilor care vor rezulta în agar, se secționează primul strat (se simte după consistență atingerea celui de al doilea strat); cu ajutorul unui tub de material plastic cu dimensiunea exterioară de 7 mm, se aspiră rondelele de agar rezultate. Se poate folosi și un dispozitiv prevăzut cu o preducele centrală și 6 preducele periferice, situate la o distanță exactă de 3 mm de cel central.

Pentru reacție se folosesc următoarele elemente:

1 — un antigen AIE (anemie infecțioasă ecvină) preparat din splină de ponei sau cai, inoculați experimental cu tulpina de virus Wyoming (foarte patogenă) și sacrificați la 11 zile de la inoculare. Antigenul trebuie să fie verificat sub raportul specificității sale. El se livrează în stare liofilizată, dizolvîndu-se în apă distilată, în proporția indicată pe fiolă;

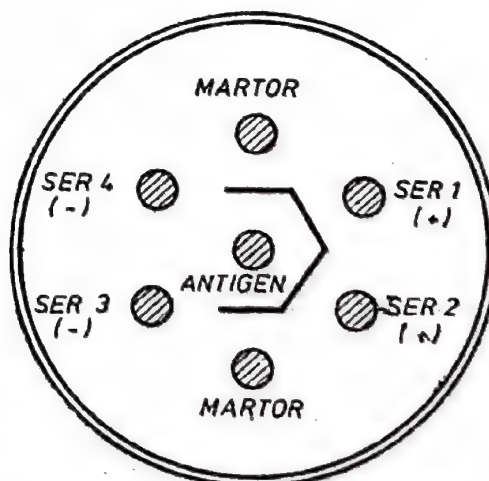


Fig. 60 — Schemă de amplasare a ingredientelor în reacția de imunodifuziune în gel de agar și liniile de precipitare care se formează

2 — ser pozitiv, verificat și care servește ca martor în interpretarea reacției;

3 — serurile suspecte provenind de la caii de examinat.

Pentru repartizarea acestora se folosesc micropipete Eppendorf sau, în lipsă, pipete Pasteur foarte fin efilate. Cantitatea este de 70 microlitri, sau mai simplu, pînă ce godeurile se umplu pînă la nivelul suprafeței agarului.

Amplasarea ingredientelor în godeurile agarului se face, în mod obișnuit, astfel: în godeul central se pune antigenul, în pozițiile 1 și 4 se pune ser pozitiv martor iar în pozițiile 2, 3, 5, 6 serurile suspecte. Deci în fiecare placă se pot testa 4 seruri suspecte. Se preferă cîte 2 godeuri cu ser martor pentru fiecare placă pentru a putea decela eventualele probe cu exces de anticorpi care nu oferă linii de precipitare, dar inhibă mai mult sau mai puțin apariția acestora în spațiul dintre antigen și martorul cel mai apropiat, astfel încît se pot face retestări cu serul respectiv diluat.

După repartizarea elementelor reacției, plăcile se acoperă și se țin la temperatura camerei. După 48 de ore, în cazul unei reacții pozitive vor apărea linii de precipitare, sub forma unor dungi albe-cenușii foarte fine, situate în spațiul dintre godeul cu antigen și serul respectiv. Ele pot fi observate numai cu ajutorul unei lămpi cu care se iluminează partea inferioară a plăcii. Între godeurile cu ser pozitiv și godeul central trebuie să existe întotdeauna linii distincte, ele servind ca element de comparație. Reacțiile pozitive nete sînt de obicei vizibile chiar după 24 de ore.



Izolarea și identificarea virusurilor în diagnosticul infecțiilor virale la animale

În ultimele decenii, s-a impus cu stringență punerea la punct a unor metode de diagnostic, precise și expeditiv, pentru izolarea și identificarea virusurilor. După descoperirea primului virus — cel al mozaicului tutunului, de către IVANOVSKI în 1892 — istoria științei medicale și veterinare este plină de încercări menite să găsească mijloace noi de diagnostic virusologic.

Primele metode s-au bazat pe posibilitățile oferite de microscopia optică și de mijloacele bacteriologiei clasice, între care, pe prim plan, s-au situat desigur inoculările experimentale.

Microscopia optică, cu toate limitele ei, a furnizat date prețioase prin punerea în evidență a consecințelor acțiunii virusurilor în țesuturi (aparitia incluziilor celulare, a alterațiilor celulare și tisulare cauzate de virusuri, a reacțiilor locale provocate de prezența virusurilor). Astfel, poate fi citată importanța pe care o are la ora actuală punerea în evidență a corpusculilor Babeș—Negri în neuronii sistemului nervos central al animalelor afectate, evidențierea incluziilor de natură virală din difterovariola păsărilor, din variola mamiferelor, din jigodia canină, din laringotraheita infecțioasă a păsărilor etc.

Punerea în evidență a corpusculilor elementari în frotiuri

Corpusculii elementari, reprezentând, după cele mai multe aserțiuni conglomerate virale, deși cu dimensiuni reduse (0,01—0,2 microni) pot fi puși în evidență la microscopul optic, dacă se folosesc metode de colorare adecvate. Trebuie precizat însă că acest examen are o importanță limitată în diagnosticul infecțiilor virale, deoarece numai o parte din agenții inframicrobieni pot fi făcuți vizibili în acest mod, iar pe de altă parte, pentru că aspectul morfologic fiind foarte asemănător la diferite specii, nu se poate face nici o diferențiere. Mai frecvent, se practică asemenea metode în cazul infecțiilor rickettsiene și pararickettsiene.

Pentru realizarea unor frotiuri bune, este important să se folosească lame subțiri, perfect degresate și nezgîriate. Ele se pregătesc în prealabil astfel:

- se mențin timp de 24 de ore în amestec sulfocromic;
- spălare, de aceeași durată, în apă curgătoare;
- păstrare în alcool 50% până în momentul întrebuințării, când se șterg cu tifon curat.

Frotiurile se realizează diferit, după materialul cercetat:

- prin impresiuni din organe ca creier, pulmon, ficat, splină, membrana vitelină (simpla atingere a suprafeței de secțiune a acestora cu una din fețele lamei);

— prin întinderea cu ansă bacteriologică a unei picături în cazul lichidelor patologice: pleural (ornitoză, febra Q), peritoneal (limfogranulomatoza șoarecelui), testicular (infecții rickettsiene experimentale), vezicular, lichide embrionare recoltate din ouăle embrionate inoculate cu asemenea agenți, secreții conjunctivale etc.

Frotiurile trebuie să fie cât mai subțiri și uniforme.

Colorarea lor se face direct sau după o prealabilă fixare. Aceasta se poate face la flacără sau recurgîndu-se la anumiți fixatori folosiți în histologie, cum ar fi de exemplu fixatorul Dubosq—Brasil (timpul de fixare este de cca 2 ore, după care lamele se spală bine cu apă distilată).

Dintre metodele de colorare, cele mai frecvent folosite sînt descrise mai departe.

Colorația Machiavello — fixarea frotiurilor la flacără

- colorarea timp de 4 minute cu soluție de fucsină diluată (0,25% fucsină bazică în soluție tampon la pH 7,2—7,4 sau în apă distilată, adusă la același pH)

- diferențierea timp de cîteva minute cu o soluție de acid citric 0,5%
- spălare imediată cu apă de robinet
- colorare de contrast timp de 10 secunde cu o soluție apoasă 1% de albastru de metilen.

Corpusculii elementari se colorează în roșu-intens-rubiniu, pe fondul albastru al elementelor celulare.

Colorația Stamp servește, ca și precedenta, cu rezultate chiar mai bune, pentru colorarea corpusculilor elementari în infecțiile rickettsiene și pararickettsiene. Constă în următoarele:

- fixarea frotiurilor la flacără
- lama răcită se acoperă cu fucsină fenicată diluată ex tempore 1/5 (1 parte fucsină concentrată Ziehl și 4 părți apă distilată) și se ține timp de 8—10 minute
- spălare cu apă de robinet
- colorare de contrast timp de 20—40 secunde, cu o soluție de verde de malahit 2%
- spălare cu apă de robinet
- uscare, examinare.

Un frotiu bine colorat are culoarea verzuie sau ușor albastruie. Corpusculii elementari se colorează în roșu-intens-rubiniu. Bacteriile se colorează în verde, albastru sau violet, după afinitate. Citoplasma celulelor se colorează în verde-pal sau în albastru-deschis.

Colorația Rommanowsky—Giemsa se folosește pentru colorarea frotiurilor în vederea punerii în evidență a corpusculilor elementari. Ames-

tecul colorant se folosește într-o concentrație dublă față de a celei utilizate în mod obișnuit pentru examenele hematologice. *Tehnica* constă în următoarele:

- colorare cu soluție Giemsa (diluată ex tempore în proporție de 30 picături la 15 ml apă distilată neutră), de preferință în băi Laveran, la 45°C timp de 12 ore, perioadă în care se recomandă înprospătarea soluției colorante de 3—4 ori

- spălare cu apă distilată
- diferențiere cu alcool 95° prin trecere alternativă în alcool apoi apă distilată, pînă cînd fondul preparatului examinat la microscop este debarasat de precipitate

- uscare
- examinare la imersie.

Corpusculii elementari apar colorați în roșu-purpuriu, pe un fond roz-pal.

Colorația Morozov se bazează pe impregnarea argentică. Ea folosește 3 soluții:

- Soluția A:
 - acid acetic glacial 1,0 ml
 - formol comercial 40% 2,0 ml
 - apă distilată 100,0 ml

- Soluția B:
 - tanin 5,0 g
 - fenol 1,0 ml
 - apă distilată 100,0 ml

- Soluția C:

- se dizolvă 5 g AgNO_3 în 100 ml apă bidistilată; 20 ml din soluție se pun de o parte, în timp ce la restul de 80 ml se adaugă, picătură cu picătură, o soluție de amoniac concentrat pînă cînd precipitatul brun, format, nu se mai dizolvă; în acest moment se iau cei 20 ml soluție lăsată de o parte și se toarnă picătură cu picătură în soluția de argint amoniacal, pînă cînd apare o ușoară opalescență. Soluțiile se păstrează în flacoane brune, bine închise.

Tehnica de colorare constă în următoarele:

- frotiul nefixat se ține 15 minute în apă distilată
- uscare
- se acoperă cu soluția A — timp de 1 minut
- spălare cu apă distilată
- se acoperă lama cu soluția B și se încălzește pînă la emisiunea de vapori

- spălare rapidă timp de 30 secunde în apă distilată
- se acoperă lama cu soluția C, diluată ex tempore în proporție de 1/10

- se încălzește pînă ce preparatul devine brun închis, avîndu-se grija ca soluția să nu fiarbă

- spălare cu apă distilată
- uscare
- examinare la imersie.

Corpusculii inframicrobieni apar colorați în brun-închis-negru, substanțele albuminoide în castaniu sau galben-deschis, iar fondul în nuanțe variabile de la galben pînă la brun.

Colorația Nicolau este o metodă simplă care folosește un singur colorant, constituit din:

- albastru de isamină (purissim) 1,0 g
- acid fenic 3,0 g
- alcool etilic 10,0 ml
- apă distilată 20,0 ml

Tehnica de colorare:

- frotiul nefixat sau fixat cu alcool metilic, se ține 15 minute în apă distilată pentru dezalbuminare
- uscare
- se acoperă lama cu colorant
- se încălzește la flacără pînă la emisia de vapori, de 3—4 ori, timp de 5—10 minute, avîndu-se grijă ca soluția colorantă să nu fiarbă
- spălare rapidă cu apă de robinet.

Corpusculii elementari apar colorați în albastru-deschis. Metoda are avantajul față de celelalte că, deși colorează mai slab corpusculii elementari, nu produce niciodată precipitate care să se preteze la confuzii.

Colorația Zdrodovski se folosește mai ales pentru punerea în evidență a rickettsiilor în preparatele mai vechi. Colorantul este tiamina fenicată, preparată astfel:

- tiamină 1,0 g
- fenol 5,0 g
- alcool etilic 10,0 ml
- apă distilată 100,0 ml

Din această soluție se prepară soluția de lucru adăugînd la 10 ml apă distilată, 10—15 picături din amestecul de bază.

Tehnica de colorare:

- frotiurile subțiri se fixează la flacără și se acoperă timp de 5 minute cu soluția colorantă
- spălarea prelungită cu apă de robinet
- uscare, examinare la imersie.

Rickettsiile apar colorate în albastru-închis, pe un fond albastru-deschis.

Punerea în evidență a incluziilor în frotiuri

Incluziile sînt consecința interacțiunii dintre virus și celula gazdă și apar ca niște formațiuni de 1—30 microni, situate în citoplasmă, în nucleu sau în ambele, de forme variabile (sferoide, ovalare sau neregulate). Prin distrugerea celulelor în care au luat naștere, pot fi puse în evidență și în stare liberă.

Ele au o afinitate cromatică oxifilă și apar de obicei înconjurate de un spațiu clar, de aspectul unui halou caracteristic ceea ce facilitează identificarea lor.

Metoda Sellers este una din metodele cele mai importante de punere în evidență a incluziilor, folosită în special pentru diagnosticul rapid al turbării.

Pentru colorare se folosește un amestec dintr-o soluție de albastru de metilen și o soluție de fucsină.

Prepararea soluțiilor:

Soluția A:

- albastru de metilen 2,0 g
- alcool metilic absolut 100,0 ml

Soluția B:

- fucsină bazică 4,0 g
- alcool metilic absolut 100,0 ml

Soluțiile se păstrează la frigider. Din acestea, în momentul folosirii se prepară soluția colorantă de lucru:

- soluție A 15,0 ml
- soluție B 2—4 ml
- alcool metilic absolut 25,0 ml.

Tehnica de colorare. Frotiul făcut din sistemul nervos central, prin amprentă, se acoperă cu soluția colorantă și se lasă astfel 4—5 secunde. Se spală, se usucă la aer (în nici un caz cu hîrtie de filtru) și se examinează la imersie. Celulele nervoase se colorează în albastru-deschis, țesutul interstițial în roz, hematiile în roșu-portocaliu, iar incluziile în roșu-rubiniu strălucitor.

În același scop se mai pot folosi și alte metode.

Colorația Mann — frotiurile snît fixate în alcool metilic timp de 5 minute, după care se usucă

- se acoperă lama cu amestecul colorant Mann (se preferă o soluție veche de cel puțin 2—3 zile)
- se încălzește la flacără pînă la emisia de vapori de 3—4 ori timp de 10 minute, avînd grijă ca amestecul colorant să nu fiarbă
- spălare rapidă cu alcool absolut
- diferențiere foarte rapidă cu alcool alcalin
- spălare cu alcool absolut
- trecere pentru cîteva secunde în alcool acid (alcool absolut cu acid acetic)

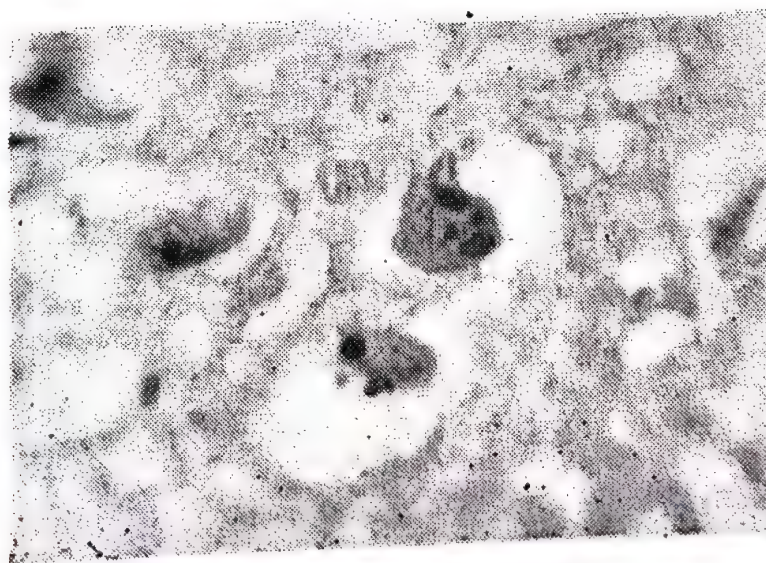


Fig. 61 — Corpusculi Babeș-Negri

- spălare cu alcool absolut
- clarificarea cu xilol și montarea în balsam de Canada.

Incluziile apar colorate în nuanțe variind de la roșu la roșu-violaceu, pe un fond albastru-deschis sau albastru-violaceu. Hematiile sînt colorate în roșu-murdar.

Metoda Muromțev — frotiurile proaspete, chiar umede, se fixează în alcool metilic sau acetonă, timp de 1—2 ore, la temperatura camerei sau timp de 20 minute la 45°C

- spălare cu apă distilată
- se acoperă frotiurile timp de 5—10 minute cu soluție de albastru de metilen 2% preparată după formula Manson (albastru de metilen 2,0 g și borax 5,0 g la 100 ml apă distilată fierbinte)

— fără a fi spălate, frotiurile se trec într-o soluție apoasă de tanin 10%, pînă la apariția unei colorații albastră-deschisă a întregului frotiu (cca 10 minute)

- spălare cu apă distilată
- uscare
- trecere rapidă în amestecul alcool absolut-acetonă, în părți egale și apoi, tot rapid, în alcool absolut.

Incluziile apar colorate în violet, pe un fond albastru-palid, cu nucleii albaştri.

*
* *

Dintre metodele folosite de bacteriologie care au fost foarte utile diagnosticului virusologic, filtrarea a fost cea care a furnizat primele relații cu privire la însăși existența virusurilor. Trecerea virusurilor prin filtrele care opresc bacteriile și reproducerea cu ajutorul filtratelor a unor stări de boală asemănătoare cu a animalelor de la care provine materialul respectiv, este indiciul existenței unui agent care a traversat aceste filtre și este responsabil de tulburările respective. Reproducerea pe animale de experiență (cobai, șoareci, hamsteri, șobolani etc.) a unor stări de boală în serie, a constituit metoda prin care s-a demonstrat multă vreme un diagnostic virusologic. Au fost folosite cele mai variate specii de animale de laborator și din natură, însă, cu toate succesele remarcabile obținute în experimentul pe animale, adulte sau extrem de tinere, aflate în stare fiziologică normală sau cu un metabolism modificat prin metode chimice sau fizice, acestea nu au dat rezultate pe deplin satisfăcătoare pentru toate virusurile.

Introducerea organismelor embrionare, care sînt mai puțin diferențiate din punct de vedere morfologic și funcțional și deci mai susceptibile la multiplicarea virusurilor, a determinat un salt calitativ substanțial în evoluția inframicrobiologiei. Folosirea embrionilor, și în special a celor de găină, a permis cultivarea de virusuri noi, și în același timp, cercetarea relațiilor calitative și cantitative ale virusurilor cu organismul-gazdă. Ea a stat și la baza preparării unor noi tipuri de vaccinuri antivirale.

La ora actuală izolarea, întreținerea și cercetarea virusurilor se bazează pe folosirea următoarelor procedee principale: culturi celulare; ouă embrionate; animale de experiență.

Recoltarea și prepararea materialului patologic

Materialele patologice care se recoltează în vederea izolării unui agent viral pot proveni de la animale în viață sau de la cadavre. După natura lor pot fi:

- fragmente de țesut (sistem nervos central, ganglioni, organe interne etc.);
- secreții și excreții (fecale, urină, lichide de spălături nasofaringiene, conjunctivale etc.);
- diferite lichide organice (lichid cefalorahidian, sânge, conținutul erupțiilor veziculare, lichide embrionare etc.).

Pot servi pentru izolarea unor virusuri și alte elemente ale mediului extern care se presupune că au fost contaminate (apele potabile, reziduale etc.).

Dacă unele materiale patologice pot fi inoculate ca atare (în cazul în care ele sînt recoltate în condiții de asepsie și nu conțin germeni bacterieni ab initio), altele necesită o prelucrare, atît pentru sterilizarea lor sub raport bacteriologic, cît și pentru aducerea lor într-o formă adecvată inoculării.

a) *Fragmentele de țesut* se recoltează în condiții cît mai severe de asepsie (prin biopsie sau necropsie), se spală de eventuale cheaguri de sânge, după care se mojarază în mojar sterile sau se omogenizează în omogenizatoare (mixere) special destinate acestui scop. Omogenizarea se va face adăugînd soluție fiziologică sterilă sau soluție Hanks în proporția necesară pentru a realiza o suspensie de 1/10—1/20. Suspensia obținută va fi congelată la -20°C , -60°C și decongelată de cîteva ori (cu scopul de a obține distrugerea celulelor și punerea în libertate a materialului viral). După ultima dezghețare, suspensia se centrifughează 45 minute la 4000—6000 turații/minut, obținîndu-se un supernatant limpede, care se folosește pentru inoculare.

b) *Fecalele* servesc ca material patologic pentru izolarea enterovirusurilor la bovine și porcine, adenovirusurilor etc. Ele se recoltează în recipiente sterile (eventual cu dop de sticlă și cu o linguriță specială), sau în eprubete cu soluție Hanks și anse cu tampoane de vată sterile. Prin adăugarea unei soluții fiziologice obișnuite, a unei soluții saline tamponate sau a soluției Hanks, se va realiza o suspensie 1/10 care, după omogenizarea temeinică, va fi centrifugată 20 de minute la 3000 turații/minut pentru debarasarea de particule mari. Supernatantul se va împărți în două probe separate, uneia adăogîndu-i-se 500 UI penicilină/ml și 5 gamma streptomycină/ml, iar cealaltă fiind inclusă într-o fiolă care se păstrează ca rezervă. Ambele probe se depozitează la -20°C . După 24 de ore proba conținînd antibiotice se decongelează, se centrifughează 45 minute la 5000—6000 turații/minut. Supernatantul se decantează, el urmînd a fi inoculat.

c) *Secreții nasofaringiene* se recoltează cu ajutorul unor tampoane de vată fixate pe baghete metalice, introduse în eprubete și sterilizate odată cu acestea prin autoclavare. După recoltare se procedează la suspendarea materialului recoltat în soluție salină tamponată (SST) sau soluție salină Hanks cu antibiotice, se congelează 24 de ore la -20°C , după care se decongelează și se centrifughează 45 minute la 4000—6000 turații/minut.

d) *Urina* se centrifughează, se aduce la un pH de 7,2—7,4 cu o soluție tampon, se adaugă antibiotice, se ține la 37°C 30 minute după care se inoculează.

e) *Sîngele și lichidul cefalorahidian* nu necesită nici un fel de prelucrare prealabilă, dacă sînt recoltate în condiții de asepsie. Sîngele se poate folosi ca sînge total, heparinizat, sînge coagulat sau numai serul sanguin.

f) *Lichidele veziculare*, obținute prin puncția veziculelor din bolile eruptive, cum ar fi febra aftoasă și exantemul vezicular al porcului, se vor folosi ca atare sau se vor dilua eventual în SST sau soluție Hanks sterilă. Se va avea grijă ca recoltarea să se facă aseptice, suprafața tegumentului dezinfectîndu-se, în prealabil, cu alcool sau cu alt antiseptic, însă de așa manieră încît acesta să nu vină în contact cu lichidul vezicular, deoarece ar putea avea efecte nocive pentru virusurile respective. Seringa și acele cu care se face puncția trebuie să fie și ele sterilizate în prealabil, dar numai prin fierbere.

În cazul unor boli eruptive (febra aftoasă și exantemul vezicular al porcului) este bine să se recolteze lichide veziculare (din vezicule ne-spate) însoțite de epiteliu din afte proaspăt spate (1—2 g). Ele se spală în ser fiziologic steril tamponat (pH 4—7,6) în eprubete sterile.

g) *Probele de ape reziduale* se recoltează steril, se adaugă antibiotice și fungostatice, se congelează la —20°C, se decongelează, se centrifughează și din supernatant se fac inoculări.

Baza materială necesară pentru lucrările de virusologie

Un laborator de virusologie corespunzător trebuie să fie dotat cu diferite încăperi care să permită desfășurarea lucrărilor de prelucrare a materialelor patologice, de izolare și identificare a virusurilor, fără pericolul de a disemina materii virulente și fără riscul de a contamina personalul.

O primă parte este reprezentată de filtrul cu dezinfectant pentru încălțăminte și mîini, vestiar și dușuri.

Laboratoarele sînt, în funcție de volumul de lucrări, diversitatea acestora și personalul de care se dispune, mai numeroase sau mai restrînse numeric. În orice caz este total contraindicat ca în laboratoarele destinate virusologiei să se desfășoare și lucrări de bacteriologie sau micologie. Ele trebuie să dispună de termostate sau cameră termostată precum și de frigidere, congelatoare sau camere frigorifice proprii. Același lucru este valabil pentru celelalte anexe: camera de sterilizare, „bucătăria” și încăperile destinate animalelor de experiență. Toate încăperile secției de virusologie trebuie să aibă canalizare proprie cu posibilități de sterilizare termică sau chimică. Pardoseala și pereții pînă la o înălțime de 1,80—2 m, în toate încăperile trebuie să fie ușor de spălat și dezinfectat (de preferință material plastic respectiv faianță sau în ulei). Pentru asigurarea condițiilor de sterilitate, mai des în cazul inoculărilor, este absolut necesar să existe boxe sterile, bine etanșizate, cu posibilități de sterilizare prin raze ultraviolete, cu sursă de gaze, vacuum și eventual evacuare prin filtru.



Fig. 62 — Sticlărie folosită în lucrările de virusologie

Mobilierul este bine să fie ușor de curățat și dezinfectat (de preferință acoperit cu un strat de materiale sintetice, cel puțin pe suprafețele unde se lucrează direct).

Ustensilele și instrumentarul trebuie să fie de bună calitate (din materiale inoxidabile) și în număr suficient pentru a permite o continuitate a fluxului de lucrări chiar în condițiile unui volum sporit.

În vederea spălării corespunzătoare a sticlăriei, trebuie să se prevadă vase mari de 10—30 l, din material plastic, rezistent față de acizi pu-

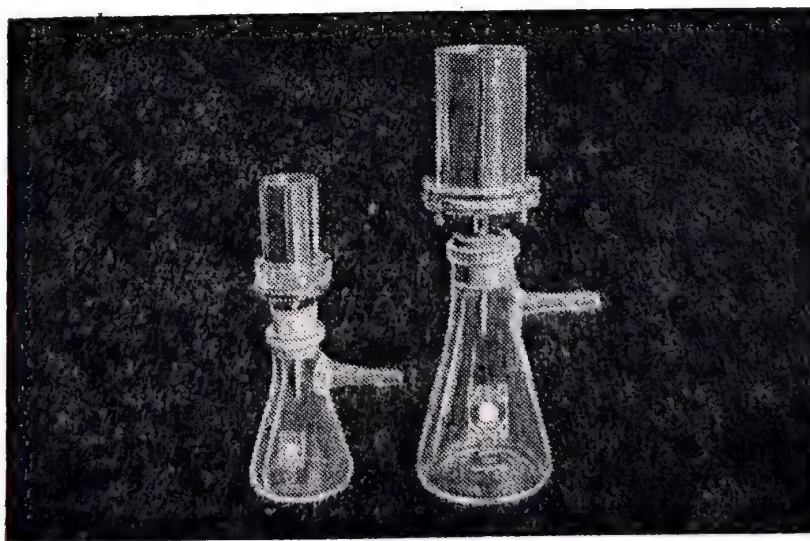


Fig. 63 — Filtre Seitz

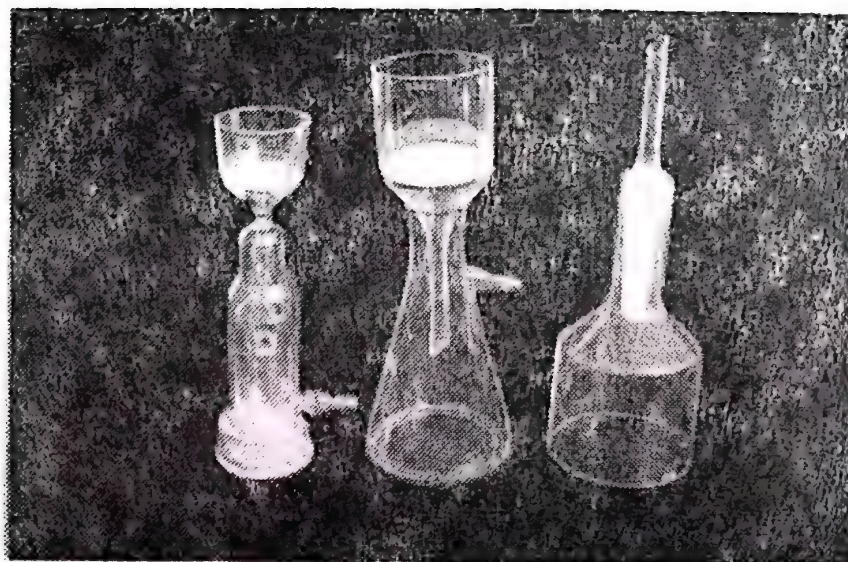


Fig. 64 — Filtre de sticlă

ternici, iar pentru uscare suporturi speciale sau dulapuri termice (100°C). Pentru sterilizare trebuie să existe atât autoclave cât și etuve. În general, este bine ca sectorul de sterilizare să fie împărțit în două: o parte pentru materiale contaminate și alta pentru materiale sterilizate. Unde condițiile o permit, despărțirea se poate face prin amplasarea unor mijloace de sterilizare cu dublu acces: unul prin care se introduc pentru sterilizare (din camera cu materiale contaminate) și altul prin care se scot sterilizate.

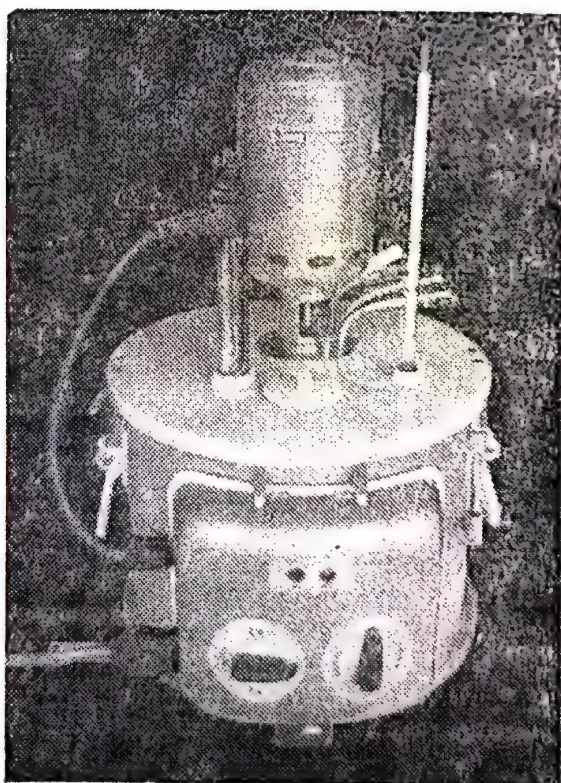


Fig. 65 — Ultratermostat Hoepler

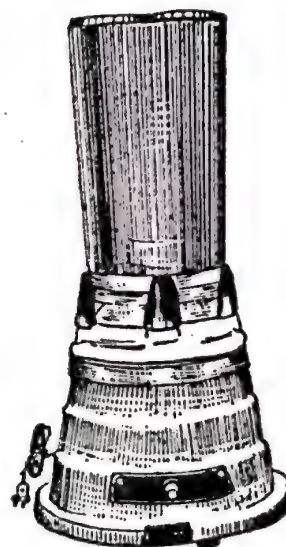


Fig. 66 — Triturator electric pentru organe

Dintre aparatele absolut necesare nu trebuie omise centrifugele de diferite capacități (eventual cu refrigerare), dar neapărat cu cupe de mare capacitate, omogenizatoare electrice, dispozitive de filtrare, termocupluri reglabile pentru lichide, pH-metre, balanțe analitice (de preferință automate), aparat de bidistilat apă, din sticlă și cu posibilități de deionizare, seringă automată de tip Cornwall, eventual aparat de liofilizare.

O importanță deosebită o are sticlăria ce se folosește în virusologie. Aceasta trebuie să fie de cea mai bună calitate (Jena, Pyrex sau în orice caz neutră; în țara noastră sticla neutră de Turda s-a dovedit de bună calitate). Ea trebuie prelucrată deosebit de atent, atât la prima folosire cât și pe parcurs.

Sticlăria nouă, după unele recomandări, se tratează astfel:

- se fierbe timp de 20 minute într-o soluție slabă de acid (0,2—0,3% acid sulfuric, clorhidric sau acetic);
- neutralizare cu o soluție slabă de sodă caustică (0,2%);
- spălare temeinică cu apă de robinet și clătire de cca 6—8 ori;
- clătire cu apă distilată de 3—4 ori;
- clătire cu apă bidistilată;
- tratare cu soluție 0,05—0,1% carbonat de sodiu în apă bidistilată, în vase mari smălțuite sau din aluminiu; se încălzește o oră la 60°C; se lasă să se răcească;
- clătire cu apă bidistilată, deionizată, în 2—3 băi, după care se pun cu gura în jos într-un coș sau pe un prosop curat;
- se pun la uscare în dulapuri termice;
- se sterilizează la pupinel (180—200°C) după ce, după caz, au fost astupate și învelite în hirtie sau folie de aluminiu.

Sticlăria folosită se tratează doar cu soluție de carbonat și apoi întocmai ca cea nouă.

În unele laboratoare se folosesc numai detergenți, tratamentul fiind variabil cu tipul folosit, dar în principiu după o fierbere cu detergent se procedează la spălarea individuală în apa respectivă, cu peria și clătirea abundentă cu apă de robinet (de cel puțin 6 ori), după care se face clătirea cu apă distilată, bidistilată și apoi deionizată și se sterilizează. Ca principiu general, trebuie subliniată indicația de a nu se lăsa niciodată sticlăria să se usuce înainte de spălare. Imediat după folosire se scufundă într-un dezinfectant sau se autoclavează și apoi se pune în apă distilată.

Dacă sticlăria este foarte murdară este indicat să se scufunde timp de câteva zile într-o soluție de bicromat.

Problema spălării sticlăriei poate fi însă complet rezolvată prin folosirea materialului plastic ce se aruncă după întrebuințare. Trebuie specificat însă că nu toate tipurile se pretează pentru culturi celulare.

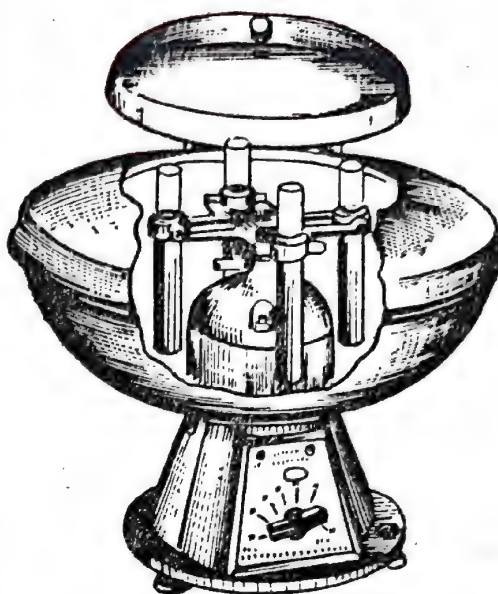


Fig. 67 — Centrifugă unghiulară

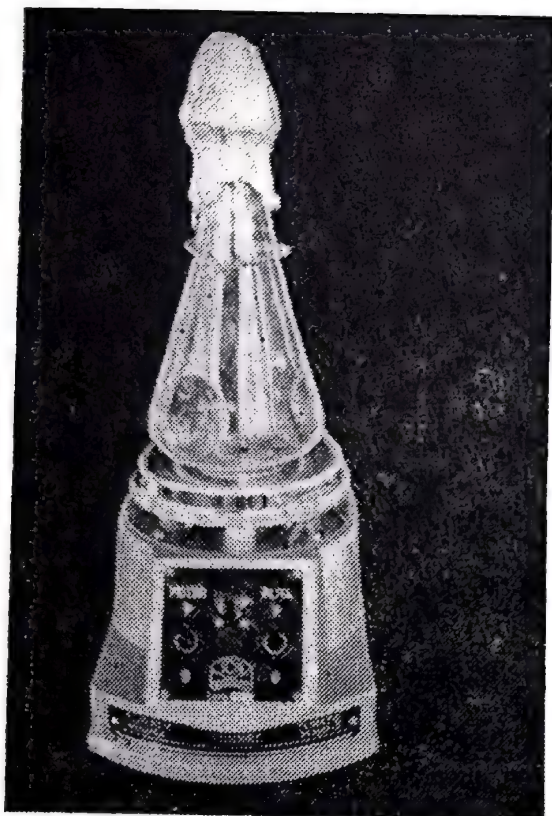


Fig. 68 — Agitator magnetic tip IOR

Dopurile de cauciuc, trebuie și ele tratate cât se poate de atent, deoarece pot să conțină substanțe sau reziduuri care îngreunează sau compromit chiar unele lucrări:

- tratare cu acid slab;
- neutralizare alcalină;
- fierbere în soluție de carbonat de sodiu 0,05—0,1%;
- spălare abundentă în apă de robinet;
- spălare în apă distilată, bi-distilată și deionizată;
- se pun apoi pe hîrtie de filtru sau tifon curat pentru uscare;
- se pun în plăci Petri mari, pe fund avînd hîrtie de filtru, se acoperă cu o altă hîrtie de filtru, se pune capacul plăcii, se împachetează în hîrtie obișnuită și se sterilizează la autoclav.

Cît privește chimicalele, ele trebuie să fie de mare puritate (p.a.), deoarece orice urme ale unor ioni (Cupru, Arseniu, Zinc etc.) sînt foarte toxice pentru culturile celulare și pot

compromite total lucrările de virusologie. Cînd este vorba de anumiți aminoacizi este bine să se prefere acele produse care poartă specificarea „pentru culturi celulare“.

Culturile celulare în diagnosticul virusologic

Găsirea unei modalități propice pentru cultivarea virusurilor a fost o necesitate obiectivă, dat fiind faptul că virusurile, după cum se știe, sînt cultivabile numai pe celula vie. Ele nu sînt capabile să se multiplice în medii inerte, în afara celulei vii și nici să desfășoare procese metabolice independente. Replicarea lor este asigurată de către celula-gazdă care, pe baza informației genetice imprimată de virus, își modifică întregul cod al sintezelor celulare.

Introducerea culturilor celulare în virusologie a reprezentat unul din cei mai importanți pași în cunoașterea virusurilor. Posibilitatea de a întreține în condiții artificiale, de laborator, grupuri de celule vii, cu capacitatea de a desfășura un metabolism propriu activ (realizată pentru prima dată de HARRISSON în 1907), a creat premisele cultivării virusurilor și implicit ale studierii relațiilor intime care se stabilesc între acestea și celulele gazdă.

În principiu, culturile celulare sînt celule vii, aparținînd diferitelor tipuri de țesuturi, normale sau patogene, adulte sau embrionare, mai mult sau mai puțin diferențiate. Dacă țesuturile adulte se cultivă mai greu, au o dezvoltare mai lentă și o viabilitate mai scurtă, țesuturile em-

brionare se cultivă mai ușor, au o creștere rapidă și o viabilitate mai mare. Ele sînt, de fapt, preferate atît în procesele de izolare, cît și în cele de întreținere a virusurilor.

Pentru cultivarea celulelor într-un mediu artificial se pot folosi metode diferite. Cele mai importante sînt următoarele:

- cultura pe lamă (fragmente de țesuturi sînt incluse în coaguli de plasmă pe suprafețe de sticle);
- cultura în suspensie, în care celulele plutesc în lichide nutritive;
- cultura în monostrat, în care celulele, prin diviziune, constituie un strat uniform pe suprafața inferioară a recipientului cu mediu nutritiv. Aceasta din urmă este cea mai larg folosită în practică.

Din alte puncte de vedere culturile celulare pot fi:

— *culturi celulare primare*, sau culturi de celule proaspete, se prepară din diferite țesuturi normale prelevate direct din organism, de preferință embrionare. Spectrul virusurilor ce se cultivă pe ele este de cele mai multe ori relativ larg. Astfel, sînt culturile de fibroblaști de pui, culturile epiteliale embrionare de la păsări și mamifere, celulele renale și testiculare de la embrioni sau animale foarte tinere;

— *culturi de linii celulare diploide* sînt culturi de celule primare propagate în serie, constituite din cel puțin 80% celule cu același număr de cromozomi și aceeași morfologie cromozomică (cariotip) ca și celulele din țesutul de origine. Numărul de pasaje ce poate fi efectuat depinde într-o măsură considerabilă de țesutul și specia de animal din care provin. Unele țesuturi bovine și porcine pot fi pasate de 30—60 de ori, în timp ce cele de la alte specii, de obicei, nu mai mult de 5—6 ori. Au o morfologie fibroblastică, chiar dacă provin din celule epiteliale, cam după al 5-lea pasaj. Nu se cultivă în submersie. Susceptibilitatea lor față de diferite virusuri este identică cu aceea a țesuturilor primare;

— *culturi celulare permanente, heteroploide sau seriale* sînt celule cu un număr anormal de cromozomi și morfologic capabile de a fi menținute indefinit *in vitro* prin pasaje în serie. Ele sînt denumite în general linii celulare permanente și se caracterizează prin număr cromozomial heteroploid, lipsa unei diferențieri histotipice, prin semnele morfologice ale unei degenerări maligne, prin creștere în submersie și un spectru viral mai restrîns decît precedentele. Provin din diferite țesuturi tumorale maligne (mai ales de tip epitelial, dar și conjunctive — sarcoame). Au o proliferare foarte activă și o rată de multiplicare mare. Se bucură de o largă răspîndire în laboratoarele de virusologie și genetică avînd o uniformitate morfologică celulară, sînt ușor de manipulat și pot fi folosite de laboratoare diferite (aceeași linie celulară permițînd desfășurarea investigațiilor între aceiași parametri) și, în fine, exclud posibilitatea precontaminării cu alte virusuri (cum se întîmplă uneori în cazul culturilor de celule primare). Astfel, pot fi amintite liniile celulare HeLa (din carcinom de col uterin uman), HEp2 (din carcinom laringian uman), Detroit 6 (din carcinom pulmonar uman), KB (din carcinom nasofaringian uman), BHK-21 (din rinichi de hamster), Vero (din rinichi de maimuță etc).

Recoltarea țesuturilor destinate culturilor celulare primare trebuie să respecte următoarele principii:

- animalul de la care provin trebuie să fie indemn de boli bacteriene și virale;

— să se asigure condiții de asepsie cât mai riguroase (recoltarea să se facă în recipiente și cu instrumente sterilizate) evitându-se folosirea de substanțe antiseptice;

— țesutul recoltat să fie cât mai puțin traumatizat (strivit cu pensa, zdrobit etc.) pentru a nu se distruge o cantitate prea mare de celule;

— recoltarea să se facă cât mai curînd după sacrificare, pentru ca viabilitatea țesuturilor recoltate să nu aibă de suferit;

— timpul scurs între recoltarea și prelucrarea celulelor pe cât posibil nu trebuie să depășească 3—4 ore, în acest interval asigurîndu-se o temperatură joasă ($+4^{\circ}\text{C}$) și un mediu salin cu antibiotice.

Dezavantajul culturilor primare constă în aceea că ele pot fi folosite, de cele mai multe ori, o singură dată, fără ca din ele să se mai poată face pasaje celulare ulterioare. Pentru unele celule sînt totuși posibile 2—10 subpasaje. Din altele se pot obține linii celulare continue (culturi permanente).

Modul de recoltare diferă în funcție de natura țesutului ce urmează a fi prelucrat. În cazul țesuturilor embrionare animale (iepuri, șoareci, cobai, șobolani) se procedează la sacrificarea rapidă a femelei gestante și la extirparea chirurgicală, în condiții de asepsie cât mai severe, a uterului. Embrionii sînt apoi eliberați de învelișurile placentare și trecuți în recipiente sterile, după care se trece la recoltarea aseptică a organelor sau a porțiunilor de organe necesare preparării culturilor celulare (rinichi, testicul, pulmon, ficat, rar piele sau diferite alte epiteli). Vîrsta embrionilor variază cu scopul urmărit, în sensul că pentru cultivarea celulelor de embrion total se preferă embrionii tineri, din prima perioadă a gestației, în timp ce pentru celule din anumite organe se vor prefera embrionii de la sfîrșitul gestației, cînd aceștia sînt deja dezvoltăți.

Embrionii de pasăre se folosesc în general între a 9-a și a 13-a zi de incubatie.

Pentru recoltarea de țesuturi de la tineret, vîrsta animalelor este variabilă cu specia (viței 1—2 luni, purcei 1—2 luni, pui și boboci 3—4 săptămîni, căței 1—2 luni etc.). Sacrificarea prin sîngerare este urmată de prelevarea și prelucrarea aseptică a organelor respective.

În cazul țesuturilor, provenind de la animale în viață, acestea se recoltează prin intervenție chirurgicală (biopsie: pîele, mucoase, amigdale, ganglioni, mușchi, ficat, rinichi etc.). Ele se introduc imediat într-o soluție salină cu un conținut ridicat de antibiotice (600—1000 U.I. penicilină/ml și 300—500 gamma streptomycină pe ml) în care vor fi lăsate 2—3 ore.

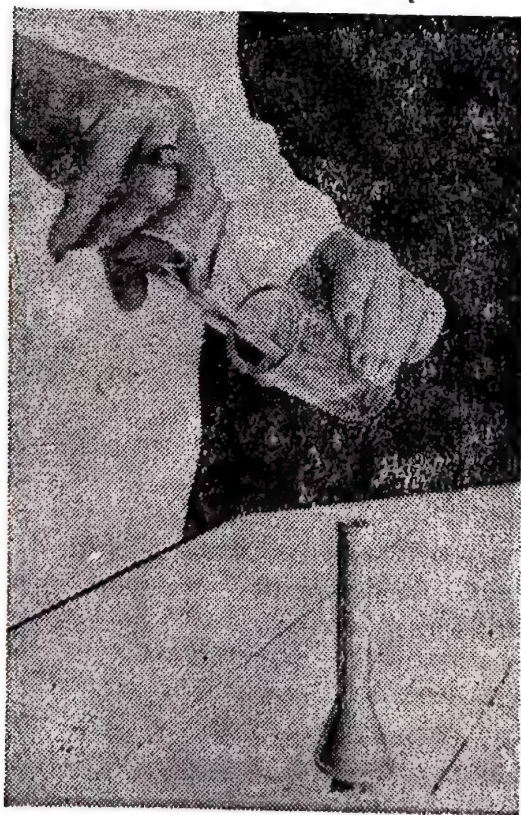


Fig. 69 — Mărunțirea manuală a organelor în cupa de centrifugă

Recoltarea este urmată de o serie de operațiuni menite să separe celulele una de alta, obținându-se suspensii celulare uniforme. În acest scop, se procedează întâi la spălarea țesuturilor de coagulii de sânge, și de detritusurile tisulare, folosindu-se soluții saline sterile (Hanks sau soluții tampon), după care urmează fragmentarea cât mai fină cu ajutorul unor instrumente sterilizate prin fierbere (foarfeci, pense, bisturie). Separarea propriu-zisă a celulelor se realizează fie prin metode fizice (agitarea suspensiilor de fragmente tisulare embrionare și decantarea), fie prin metode chimice, folosindu-se substanțe care dizolvă chit-ul intercelular. Dintre acestea, cele mai bune rezultate le oferă tripsina, pancreatina, papaina, collagenaza, elastaza. Prima este cel mai frecvent folosită, concentrația optimă fiind de 0,25%. De fapt în cazul metodelor chimice nu este vorba de o acțiune pur chimică, ci de asocierea unor factori chimici (enzime sau agenți chelatori) cu factori mecanici (agitarea).

Contează foarte mult și marca tripsinei, în sensul că, de exemplu, în timp ce tripsina Difco și N.B.C. dau suspensii celulare omogene, tripsina Merck și BDH, deși dau inițial suspensii de calitate, în timp ele tind să aglutineze în mase mucoide care nu permit o bună cultivare. Dizolvarea tripsinei se face în soluții saline tamponate (SST) la un pH 7,4—7,6 sau în soluție nutritivă Hanks.

Soluția salină tamponată (SST sau PBS — Phosphat buffered solution) se prepară sub formă de două sau trei soluții-stoc, concentrate de 10 ori.

Soluția I:

— NaCl	80,0 g
— KCl	2,0 g
— Na_2HPO_4	11,5 g
— KH_2PO_4	2,0 g
— Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Soluția II:

— CaCl_2 anhidru	1,0 g
— Apă bidistilată ad	500,0 ml

Soluția III:

— $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
— Apă bidistilată ad	500,0 ml

Soluțiile se păstrează în sticle separate la $+4^\circ\text{C}$. Înainte de folosire, ele se diluează astfel: 100 ml soluție I + 700 ml apă și separat 50 ml soluție II + 50 ml apă, și 50 ml soluție III + 50 ml apă, care apoi se amestecă și se sterilizează la autoclav (20 minute la 0,8 atmosfere). Soluțiile II și III pot fi omise, în acest caz diluarea soluției I făcându-se în proporție de 100 ml soluție concentrată + 900 ml apă bidistilată.

Tripsinizarea

Tripsinizarea se realizează în flacoane asemănătoare cu baloanele Erlenmayer, doar că li s-au adus diferite modificări (renuri, tuburi de captare laterală etc.), cu scopul de a realiza o cit mai rapidă separare și captare a celulelor. Contactul cât mai intim cu țesutul și continua agitare sînt realizate cu ajutorul unor agitatoare magnetice. Flacoanele

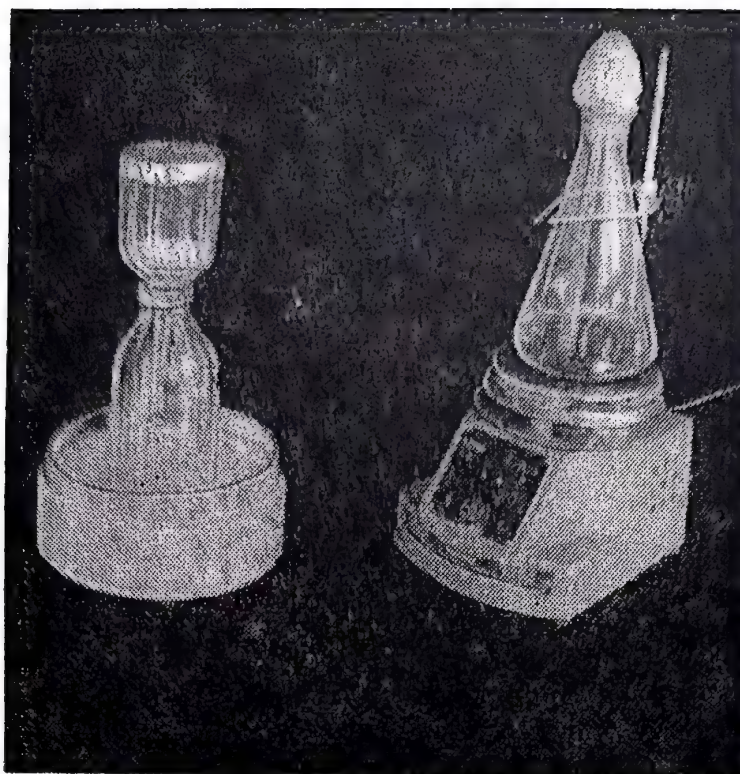


Fig. 70 — Tripsinizarea discontinuă deschisă

de tripsinizare sînt sterilizate în prealabil, avînd în interiorul lor o bară magnetică îmbrăcată în sticlă, material plastic sau silicon, care realizează omogenizarea permanentă a suspensiei. Reglarea turației agitatorului trebuie să fie astfel făcută încît să nu fie prea mare. Înaintea începerii tripsinizării propriu-zise, se recomandă o pretripsinizare de 30—45 minute la 34°C , sub agitație continuă la agitatorul magnetic, avîndu-se grijă ca peste fragmentele de țesut să se adauge o cantitate de 5—10 ori mai mare de tripsină.

Ea are loc la o temperatură optimă de $34\text{—}37^{\circ}\text{C}$ (în nici un caz peste 40°C). După 5—10 minute de agitație, urmată de un repaus de cca 30 secunde, se colectează într-un vas separat suspensia de celule astfel obținută și se aruncă. Peste țesuturile din flaconul de tripsinizare se adaugă o nouă cantitate de soluție de tripsină, care se resupune aceluiași proces, obținîndu-se în acest fel o serie de șarje de suspensii celulare, pînă la epuizarea țesutului. Țesutul se consideră epuizat cînd majoritatea

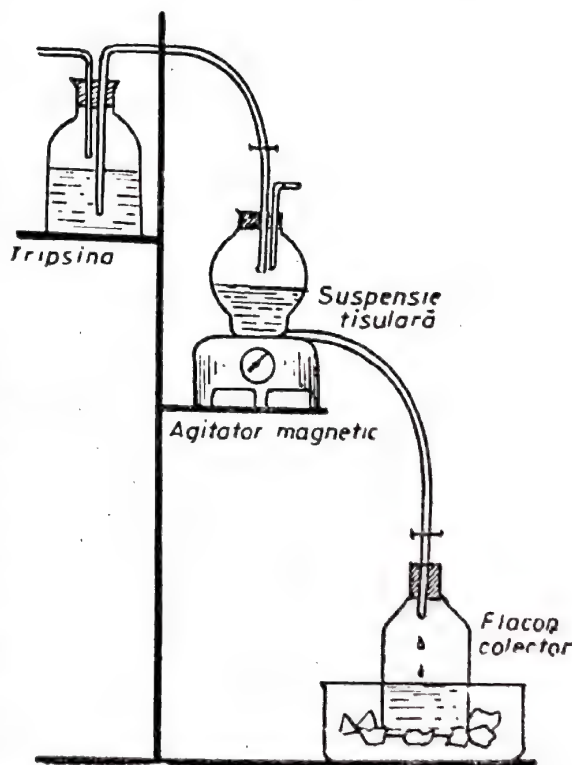


Fig. 71 — Tripsinizarea continuă închisă

fragmentelor au un aspect albicios, zdrențuit. Epuizarea are loc cu atât mai repede cu cât țesutul respectiv este mai tânăr (în general după 15—25 de șarje, durând 60—90 minute). Făcînd abstracție de variantele metodelor de tripsinizare (tripsinizarea continuă, discontinuă închisă, discontinuă deschisă etc.) operațiunea propriu-zisă este urmată de captarea suspensiei celulare și de oprirea procesului de tripsinizare. Aceasta se realizează prin punerea vasului în care se captează șarjele succesive de suspensie celulară într-un alt vas cu cuburi de gheață. Aceasta oprește acțiunea enzimei, prevenind în acest fel liza celulelor, prin acțiunea prelungită asupra pereților celulari. După unii autori, se obține o tripsinizare bună, cînd se lucrează alternativ cu o soluție de tripsină și SST (P.B.S.), ceea ce realizează o bună menajare a celulelor.

Separarea celulelor de soluția de tripsină se face prin centrifugare în cupe de capacitate corespunzătoare, la turații reduse (800—1 000 turații/minut timp de 6—8 minute). Sedimentul va fi resuspendat într-o cantitate cunoscută de mediu nutritiv sau, în cazul că se preconizează o spălare suplimentară, aceasta se face cu SST. Este necesar să se asigure o concentrație optimă a celulelor în suspensia finală. Ea este în jur de $3\text{--}4 \times 10^5$ celule/ml mediu. Determinarea ei se face prin măsurători în camere obișnuite de numărat elemente figurate sau, după o oarecare experiență, prin aprecierea cu ochiul liber a gradului de turbiditate a suspensiei. Pentru numărătoare, se face o diluție de 1/10—1/1000 în mediul de creștere, se adaugă o picătură dintr-o soluție 1% de albastru de tripan, și după o agitare temeinică, se pune într-o cameră Fuchs—Rosenthal, Thoma sau Türck. Prin colorare se face o diferențiere între celulele vii și moarte, numai cele moarte colorîndu-se. Se numără numai celulele vii (agregatele de celule se consideră o celulă). Numărarea trebuie să se facă imediat după adăugarea colorantului deoarece acesta acționează toxic. Este, în general, bine să se facă media din 2—3 numărători. După numărarea celulelor și prepararea concentrației optime de celule în mediul nutritiv, se trece la repartizarea în recipiente de cultură (eprubete, tuburi sau flacoane de cultură). Pentru a păstra omogenitatea suspensiei și a împiedica sedimentarea celulelor în timpul repartizării, suspensia este

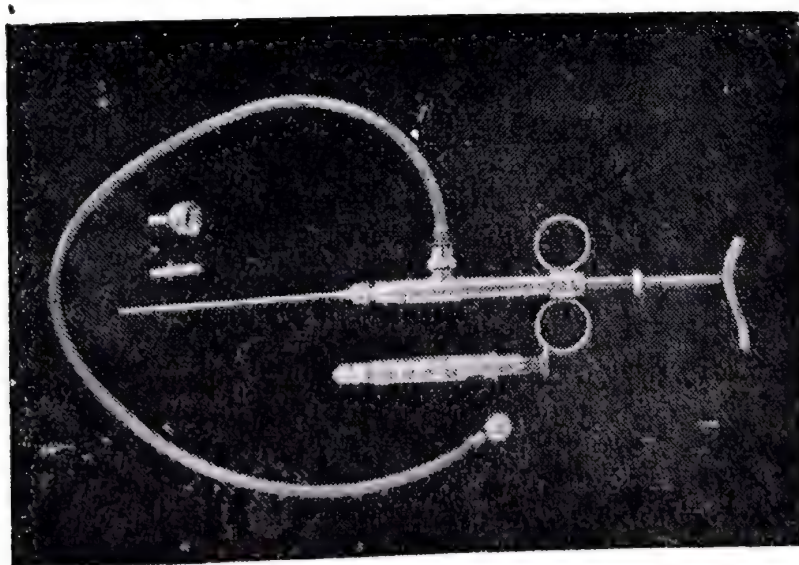


Fig. 72 — Seringă automată reglabilă pentru repartizarea lichidelor nutritive

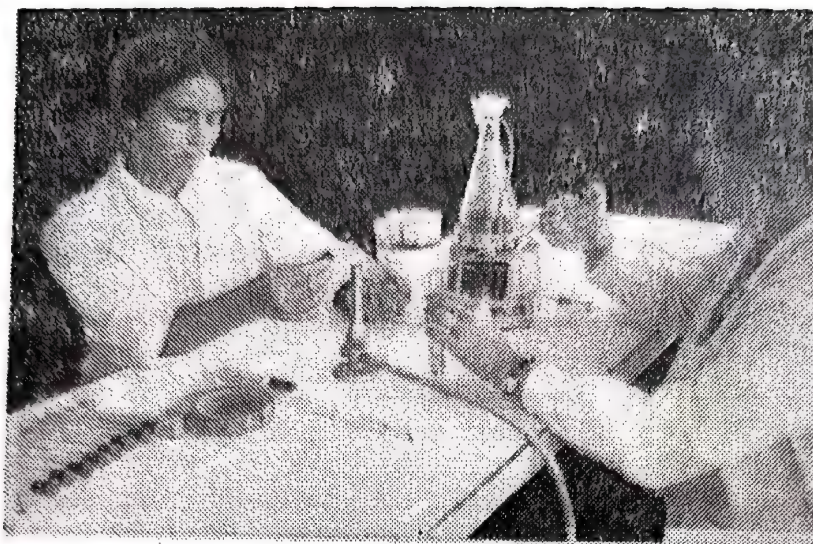


Fig. 73 — Repartizarea suspensiilor celulare cu ajutorul seringii automate

supusă unei agitații continue, cu ajutorul agitatorului magnetic, reglat la o turație redusă. Repartizarea se face cu o pipetă sterilă obișnuită, cu pipetă automată sau cu seringi automate. Numărul de celule care se inoculează în diferite vase de cultură este în funcție de suprafața de cultură a acestora. Ca regulă generală numărul de celule însămînțate este proporțional cu suprafața de cultură și invers proporțional cu dimensiunile celulei și cu puterea de multiplicare.

Vasele în care s-a repartizat suspensia celulară, sînt așezate la termostaț la 37°C în poziția corespunzătoare, pentru ca celulele, prin sedimentare, să formeze un strat cît se poate mai uniform și prin multiplicare să realizeze cultura celulară dorită.

În cazul eprubetelor ele se așază în stativ speciale (de lemn, material plastic sau metalice) care asigură o poziție înclinată în așa fel ca mediul să nu ajungă pînă la dop. Pe partea superioară a tubului se face un semn pentru ca după eventuale examinări sau mișcări ale tuburilor, ele să fie repuse în aceeași poziție.

Lichidele nutritive în care celulele se suspendă și care asigură necesarul energetic pentru creșterea și multiplicarea celulelor, sînt astfel alcătuite, încît să conțină toți principii de care ele au nevoie și un echilibru ionic care să asigure desfășurarea tuturor proceselor vitale în condiții normale.

Soluția Hanks se prepară și se livrează sub formă concentrată de 10 ori (10 ×):

NaCl	8,0 g
KCl	2,4 g
CaCl ₂	0,14 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
MgCl ₂	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,06 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Glucoză	1,0 g
Roșu fenol	0,2 g
Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Ex tempore se diluează 1/10 în apă bidistilată sterilă. Pentru ajustarea pH-ului se folosește soluția de bicarbonat de sodiu 5% sterilă, adăugată în momentul diluării în cantitate de 5—10 ml (volumul soluției de bicarbonat de sodiu se scade din volumul apei).

Această soluție se poate folosi ca mediu de bază în numeroase alte formule de medii pentru culturi celulare, ca diluant pentru hidrolizat de lactalbumină, uneori pentru tripsină sau pentru spălarea și conservarea țesuturilor destinate culturilor celulare primare.

Soluția salină Earle se prepară și se livrează sub formă concentrată de 10 ori:

Soluția I:

NaCl	68,0 g
KCl	4,0 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,4 g
NaHCO_3	22,0 g
Glucoză	10,0 g
Roșu fenol	0,2 g
Apă bidistilată ad	1000,0 ml

Soluția II:

CaCl_2 anhidru	2,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,7 g
Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Soluțiile respective se conservă separat la +4°C, iar înainte de folosire se diluează: 100 ml soluție I + 700 ml apă bidistilată încălzită la 80°C timp de 20 minute, se amestecă după răcire cu 50 ml soluție II + 150 ml apă bidistilată, diluate separat.

Se mai folosesc mediile 199 (Morgan, Marton—Parker), mediul IC—65, mediul Eagle etc. Mediul inițial în care sînt însămînțate celulele este bine să aibă pH-ul 7, mai ales în cazul celulelor epiteliale. Formula cea mai simplă de mediu utilizată în culturile celulare este ser + soluție salină (Hanks sau Earle) + antibiotice. O formulă mai complexă și mai des folosită este: hidrolizat de lactalbumină 0,5%, ser de vițel 2%, soluție salină Hanks 97,5%, antibiotice (penicilină 100—200 U.I./ml, streptomycină 50—100 gamma /ml, stamicin 20—40 U.I. pe ml). Soluția salină Hanks ca și soluția Earle sînt astfel constituite încît să asigure echilibrul osmotic și deci un schimb normal de ioni între celulă și mediu. Schimbarea treptată a pH-ului, datorită proceselor metabolice pe care celulele le desfășoară, este indicată de roșul de fenol inclus în mediu și care virează culoarea și semnalează necesitatea improspătării lui. Schimbarea mediului în aceste culturi se face după cca 3—5 zile, cînd mediul din roșu virează spre galben-portocaliu. Ea se efectuează cu pipete obișnuite sau, preferabil, cu seringi automate. În cazul culturilor în flacoane, după 24 de ore se face schimbarea mediului, pentru a elimina celulele moarte și resturile de hematii. În cazul culturilor în tuburi acest lucru nu este, de regulă, necesar.

Avînd asigurate condiții optime, fiecare celulă, sau grup de celule, constituie un mediu de multiplicare, un punct de plecare de la care, prin diviziunea celulară repetată, se obține în citeva zile (1—8) un monostrat uniform, o „pajiște” sau „covor” de celule în care abia se mai disting nucleeele inițiale.

Morfologia celulelor cultivate *in vitro* este relativ diferită de a celor aflate în țesuturile de origine, condițiile de creștere și sarcinile metabolice suferind anumite modificări. Celulele epiteliale, de exemplu, în culturile celulare iau o formă mai curînd poligonală, fiind denumite celule epiteloide (*epithellike cells*). Fibroblastele sînt celule fusiforme sau cu un aspect neregulat, avînd proprietatea de a forma fibre. Celulele care, prin aspectul lor morfologic, se aseamănă cu fibroblastele se numesc fibroblastoide (*fibroblastlike cells*).

În cazul culturilor cu creștere lentă este necesară înprospătarea mediului nutritiv. La culturile permanente această schimbare se face de obicei la 3 zile, iar la cele primare după 4—7 zile. Meticulozitatea efectuării tuturor operațiunilor de pregătire a culturilor ca și calitatea mediilor folosite sînt condiții primordiale pentru a obține culturi de calitate. Trebuie subliniat că tehnica preparării culturilor celulare este foarte pretențioasă. Neglijarea unor aspecte, uneori chiar neînsemnate în aparență, cum ar fi de exemplu calitatea apei sau a sticlăriei, poate să compromită total reușita întregii tehnologii.

Există și tehnici de obținere a monostratului celular pe întreaga suprafață a recipientului (prin rotație cu ajutorul unor dispozitive speciale) ca și culturi de celule în suspensie, prin care celulele sînt obligate, prin diferite procedee mecanice, să rămîină în suspensie și să se multiplice în toată masa mediului. Cultura staționară a luat însă cea mai largă folosire și datorită faptului că nu toate tulpinile de celule se pretează la cultivarea în suspensie.

Pentru întreținerea în laborator a liniilor celulare sau pentru efectuarea pasajelor succesive de celule neinoculate, se procedează de obicei la așa-numita versenizare (de la versen — sarea de sodiu a acidului etilendiamintetraacetic, denumit și EDTA, complexon III sau titriplex). În acest scop se înlătură lichidul nutritiv, se pune în loc o soluție sterilă de versen 0,02%, se incubează 30 de minute la 37°C, timp în care se realizează o bună dispersare a celulelor (se produce o separare a celulelor asemănătoare cu cea produsă de tripsină; spre deosebire de tripsină însă, versenul nu este nociv pentru celule, nici după un contact mai îndelungat — o oră. Suspensia de celule este apoi recoltată cu o pipetă Pasteur sterilă (după ce s-au făcut cîteva barbotări de omogenizare) și se trece într-o eprubetă de centrifugare sterilă. În cazul în care celulele sînt cultivate în vase mari, se poate introduce o bară magnetică sterilă, procesul de desfacere chimică fiind ajutat de agitația magnetică.

Sedimentul celular se resuspendă, după 1—2 spălări în SST, în lichid nutritiv și se repartizează în tuburi sau flacoane de centrifugă, la concentrație celulară optimă. În acest fel, se obține un nou pasaj, care se poate repeta de un număr variabil de ori, în funcție de linia celulară (în cazul celor permanente, practic indefinit).

Pentru a evita, în cazul folosirii culturilor de celule diploide, pierderea culturii primare de celule din care acestea provin, se poate recurge la păstrarea cîtorva tuburi în stare congelată, ca la nevoie să se poată apela la ele. În acest fel, se poate lucra cu aceeași linie diploidă ani de zile, cu condiția evitării contaminărilor microbiene. Pentru controlul proprietăților unei astfel de linii celulare se recomandă să se facă periodic analiza cromozomilor (numărul și morfologia lor).

Congelarea la -70°C este superioară prin folosirea unui conservant chimic (glicerol 15% sau dimetilsulfoxid 10% în mediu nutritiv). Acesta pătrunde rapid prin procesul de congelare în celule, inhibă, prin fixarea de apă, formarea de cristale intracelulare de gheață și se evită în acest fel alterarea celulelor.

Mai favorabilă este congelarea lentă, prin care, pînă la -20°C temperatura scade cu 1° pe minut, după care se scade pînă la temperatura dorită. Rata de supraviețuire în acest caz este de 30—100%, în timp ce în cazul congelării bruște ea este mai mică cu 10—20%. În nici un caz, nu trebuie să se întrerupă procesul de congelare.

Temperatura de congelare de -70°C trebuie de asemenea respectată, variațiile (chiar între -50 , -60°C) ducînd uneori la rapide pierderi ale viabilității.

Optimă s-a dovedit temperatura azotului lichid, la care rata de supraviețuire a celulelor este mai ridicată datorită absenței oricăror procese enzimactice.

Decongelarea se face rapid la baie de 37°C sub agitare ușoară. La suspensia de celule se adaugă apoi cca 5 ml de mediu nutritiv de creștere, se lasă 10—20 minute să stea la temperatura camerei și apoi se lasă să sedimenteze, se elimină supernatantul, se resuspendă celulele în mediu de creștere (concentrația de 200 000 celule pe ml mediu) și se repartizează în recipiente de cultură. Această tehnică se aplică în cazul conservării oricăror culturi celulare.

Evaluarea gradului de dezvoltare a culturilor în scopul stabilirii momentului optim pentru inoculare a materialului viral, se poate face prin metode morfologice (aprecierea suprafeței acoperite de monostratul celular, determinarea indicelui mitotic, numărarea directă a celulelor) și prin metode chimice (determinarea cantității de proteine celulare, a fosforului, a consumului de glucoză etc.). Cea mai expeditivă și mai larg folosită este aprecierea gradului de acoperire a suprafeței de creștere și a uniformității monostratului celular, prin examinare la microscop.

Folosirea culturilor celulare pentru izolarea și menținerea virusurilor trebuie să țină seama de un principiu enunțat de Levaditi încă în urmă cu peste 40 de ani și anume, că virusul trebuie cultivat *in vitro* pe același tip de țesut sau celulă pentru care are afinitate *in vivo*. Aceasta nu înseamnă însă cîtuși de puțin că el nu poate fi adaptat în timp, obținîndu-se cultivarea și pe alte tipuri de celule. Trebuie de asemenea să se sublinieze că utilizarea culturilor celulare nu poate și nu trebuie să înlocuiască tot arsenalul metodologic folosit pînă acum, respectiv folosirea animalelor de experiență, examenul serologic, examenul anatomo-și histopatologic, cel biochimic etc. Ea a permis obținerea unor date extrem de utile pentru cunoașterea virusurilor cum ar fi efectul citopatic, dinamica multiplicării virusurilor din celule, mecanismele de sinteză a elementelor structurale ale virusurilor etc. Ea a facilitat izolarea în stare pură a unor virusuri necunoscute și studierea caracterelor lor.

Contaminarea culturilor celulare

Contaminarea microbiană poate avea loc:

- prin infecții latente ale organelor supuse tripsinizării;
- prin contaminări secundare, în cursul recoltării țesuturilor;

— prin contaminări în cursul lucrărilor de prelucrare sau lipsa de sterilitate a unor adaosuri (mai ales serul de vițel).

În general, liniile celulare diploide contaminate trebuie să fie eliminate.

Prima dovadă a contaminării bacteriene este prezența în mediu a unor celule plutitoare, respectiv a detritusurilor celulare, după care se poate observa o tulburare a mediului și o modificare a culorii sale, datorită virajului indicatorului (mediul devine galben).

O problemă deosebită o reprezintă contaminarea cu micoplasme. Ele sînt mai frecvente în cazul liniilor permanente, contaminarea realizîndu-se în special prin aerosolii expulzați de om (de aceea este indicat ca în cursul lucrărilor să se folosească măștile de tifon care să acopere gura și nasul), dar și prin adaosuri contaminate (serul). Este vorba mai ales de *M. hominis* și *M. orale*. În cazul culturilor primare au fost semnalate *M. hyorhina* (porc), *M. organii* și *M. laidlawii* (bovine).

Micoplasmele produc în culturile celulare uneori modificări celulare degenerative, asemănătoare cu efectele citopatice induse de virusuri, dar pot să se multiplice în culturi și fără a determina modificări celulare. În acest din urmă caz însă influențează procesul de multiplicare virală, pe care îl inhibă sau chiar îl opresc, ducînd la interpretări eronate.

Decelarea micoplasmelor se face prin însămînțări pe medii speciale (bulion PPLO) care se însămînțează cu sediment celular și după o incubare de 10 zile se pasează pe un mediu solid, citirea făcîndu-se după alte 10 zile de incubare.

Pentru debarasarea culturilor de micoplasme se pot folosi: Kanamicina (200 micrograme/ml), Neomicina (50 micrograme/ml), Gentamicina (200 micrograme/ml), Aureomicina (100 micrograme/ml). Celulele ce trebuie tratate se tripsinizează și sedimentul celular se reia într-un mediu de creștere care conține numai antibioticul corespunzător (nu și streptomycină sau penicilină). Suspensia se incubează cîteva zile pînă cînd se obține o multiplicare suficientă a celulelor. Apoi se face un nou pasaj. Tratatamentul se repetă de 2—4 ori, după care se verifică dacă mai există micoplasme.

Contaminarea cu fungi duce chiar după cîteva pasaje la alterări celulare. Miceliile sînt ușor vizibile la microscop. Pentru tratarea culturilor contaminate se poate folosi Stamycină sau Amphotericina B în concentrație de 50—100 unități/ml respectiv 2—5 micrograme pe ml.

Contaminarea cu alte virusuri se poate decela prin tipul de efect citopatic, prin hemadsorbție, hemaglutinare, anticorpi fluorescenți etc.

Analiza cromozomială a culturilor celulare

Este necesară pentru caracterizarea liniilor celulare (diploide și heteroploide). Se folosesc în acest scop culturi pe lamelă, de 24—48 de ore, din care prin adăugare de colchicină, se obține o mitoză, ca urmare a acțiunii inhibante pe care aceasta o exercită asupra aparatului fusiform, astfel încît majoritatea celulelor se vor găsi în metafază (cu așezarea liniară a cromozomilor în zona ecuatorială). Supunînd apoi celulele unui șoc osmotic, prin tratare cu o soluție hipotonică, membranele celulare crapă și pun în libertate cromosomii. Aceștia se cercetează apoi după fixare, colorare și reprezentare fotografică.

Tehnică. Peste culturi de 24—48 de ore (lamele spălate cu PBS), se adaugă soluție de colchicină (2 mg Colcemid în 10 ml PBS) astfel încât concentrația finală să fie de 2—20 micrograme/ml. După o incubare de 3—10 ore la 37°C, se elimină lichidul și se fac două spălări cu PBS încălzit la 37°C. Stratul celular se dezlipește apoi cu ajutorul tripsinei sau cu un raclet de cauciuc steril și sedimentul spălat se reia în 1 ml soluție Hanks.

Se tratează apoi cu 5 ml apă bidistilată, adăugată picătură cu picătură (pH-ul ajustat la 7,2 cu amoniac). După o incubare de 30 minute la temperatura camerei, se face centrifugarea (800—1000 t/min.).

Urmează fixarea sedimentului celular cu 2—5 ml amestec de metanol 3 părți + acid acetic glacial 1 parte (proaspăt preparat), timp de 15—30 minute la +4°C (nu se va agita sedimentul) și se va repeta încă cel puțin o dată. După centrifugare, se elimină supernatantul până rămân cca 0,5 ml și sedimentul celular se agită cu grijă.

Pentru a se obține o etalare optimă a cromozomilor pe un plan orizontal, suspensia celulară fixată se scurge pe o lamă răcită în prealabil la -20°C (se modifică tensiunea superficială și se schimbă brusc temperatura) și se usucă repede prin suflare și agitare. Citirea se face după incluzie cu balsam de Canada, la microscopul cu contrast de fază.

Se poate folosi și colorarea cu o soluție 2% orceină. În acest scop, preparatele cu suspensia celulară, uscate la aer, se acoperă pentru 30 minute cu soluția colorantă. Se face apoi diferențierea:

- 1 minut în alcool 70%
- 1 minut alcool 96%
- 1 minut în xilol.

Urmează incluzia în balsam de Canada. Citirea se face prin examen microscopic. Ea permite numai determinarea numărului de cromozomi. Pentru determinarea cariotipului este necesară fotografierea, urmată de decuparea fiecărui cromozom și așezarea în perechi care se lipesc pe hîrtie.

Inocularea culturilor celulare

Punerea în contact a materialului patologic suspect sau conținând un virus cunoscut cu cultura celulară, se poate face în mod diferit, cele mai folosite metode fiind: metoda contactului cu țesuturi infectante, metoda fragmentelor de țesut infectate *in vitro*, metoda explantelor de țesut infectate *in vivo*, metoda înglobării suspensiei virulente în cultură etc.

În rutina majorității laboratoarelor de virusologie, se practică inocularea după cum urmează: se golesc de lichidul nutritiv tuburile conținând cultura celulară și eventual se fac 1—2 spălări cu SST sau cu soluție Hanks, cu scopul înlăturării eventualelor anticorpi. În locul lichidului nutritiv, se introduce o cantitate variabilă, de 0,1—1 ml (în funcție de bogăția în virus), de suspensie de inoculat. Tuburile sau recipientele inoculate sînt incubate apoi la 36—37°C timp de o oră, timp în care se realizează contactul între virus și celulele gazdă. După o oră, în cele în care s-a introdus 0,1—0,5 ml inocul se adaugă lichidul nutritiv fără a îndepărta inoculul, în timp ce în cazul celor inoculate cu mai mult de 0,5 ml se procedează la îndepărtarea prealabilă a inoculului și numai după aceea se pune lichidul nutritiv de întreținere.

Dacă inocularea se face cu un material de cercetat ca suspensii de organe, de fecale sau urină, care adesea au efect citotoxic se recomandă ca, după adsorbție, materialul inoculat să se elimine (prin pipetare), iar monostratul să se spele cu soluție salină tamponată, și numai după aceea să se adauge mediul de întreținere. După 24 de ore, se poate face o schimbare a mediului.

Se poate face și inocularea directă în tuburile de cultură peste mediul de întreținere. În acest scop, se transferă în fiecare tub câte 0,1—0,5 ml, în funcție de concentrația inoculului și de capacitatea de multiplicare a virusului respectiv. Metoda se folosește mai ales în cazul pasajelor, în timp ce pentru izolări se preferă adsorbția.

Culturile inoculate se pun apoi la incubare la 36,5—37°C, temperatură optimă pentru păstrarea unui metabolism normal al culturilor și pentru sinteza optimă a virusurilor. Interpretarea rezultatelor se face după perioade variabile în funcție de rapiditatea cu care se multiplică virusul, însă în mod obligatoriu culturile se vor examina zilnic pentru a urmări apariția eventualelor modificări, ale monostratului sau al mediului nutritiv. Concomitent cu inocularea, este necesar să se facă și controlul sterilității inoculului prin însămînțarea lui pe medii pentru germeni bacterieni. Dacă aceștia există în inoculum, se face inocularea unor noi tuburi de culturi celulare, măbind cantitatea de antibiotice sau fungistatice.

Citirea și interpretarea rezultatelor

Prezența virusului în cultura celulară inoculată poate fi pusă în evidență prin mijloace directe și indirecte. Metodele directe nu presupun evidențierea nemijlocită a virusului, ci observarea unor modificări morfologice sau fiziologice ale substratului de celule, cauzate de multiplicarea virusului.

Unele metode sînt comune tuturor tipurilor de culturi celulare, altele sînt specifice unui singur tip. Așa de exemplu, în timp ce virajul indicatorului roșu fenol este comun tuturor tipurilor de culturi ce folosesc medii cu acest indicator, hemadsorbția și hemaglutinarea sînt legate de anumite virusuri care au această însușire.

Metode directe

1 — *Virajul indicatorului de pH (roșu fenol)* are loc ca o consecință a acidifierii mediului datorită acumulării de acid lactic, piruvic și CO_2 în cursul catabolismului celular. Culoarea mediului se modifică de la roșu aprins spre galben-portocaliu. Rapiditatea cu care se produce virajul depinde de intensitatea proceselor metabolice și de abundența celulelor. Culturile de tulpini celulare de origine tumorală modifică mediul mult mai rapid (48—72 de ore). În cazul unor virusuri, datorită multiplicării lor în celule și în ultimă instanță distrugerii acestora în câteva ore, virajul mediului nu se produce după inoculare. În cazul altora (adenovirusuri), multiplicarea induce o glicoliză în celule și acumularea de acizi organici, fapt care duce la o acidifiere mai puternică a mediului în comparație cu mediul culturilor neinoculate, în acest caz virarea spre galben denotă prezența virusului și nu lipsa lui. Trebuie specificat însă că

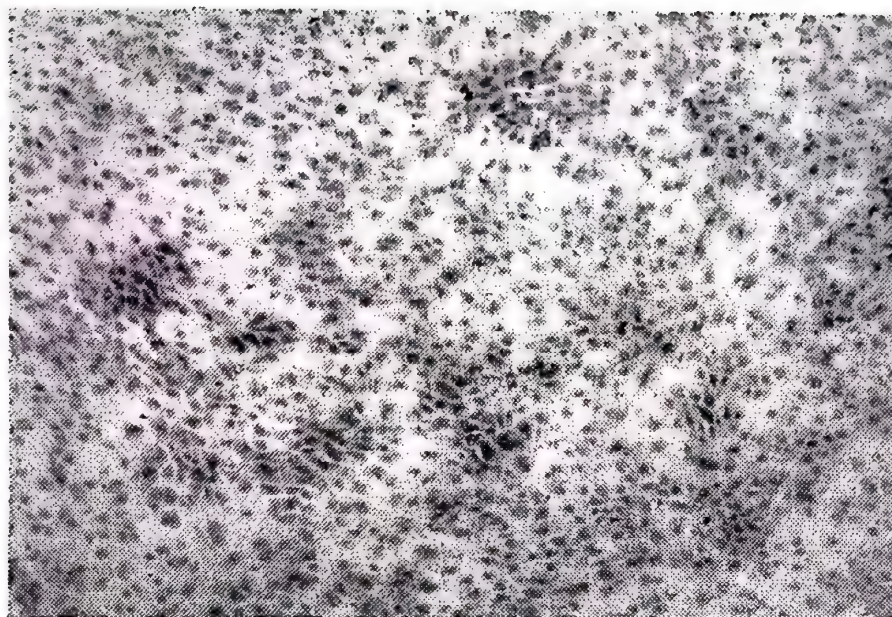


Fig. 74 — Cultură celulară de testicul de vițel neinoculată ($\times 80$)

există și virusuri care, fie că sînt de la bun început în cantitate redusă în inocul, fie că se multiplică foarte lent, modifică mult mai lent culoarea mediului. Indicațiile furnizate de această virare trebuie considerate deci ca relative.

2 — *Modificările morfologice — efectul citopatic.* Contactul unui virus cu celula din cultură poate îmbrăca aspecte cantitative și calitative foarte variate, care se situează între areactivitatea totală și distrugerea rapidă a celulei. Multiplicarea virusului se soldează cu modificări de ordin morfo-logic, mai mult sau mai puțin pronunțate ale celulei, cunoscute sub numele de efect citopatic. Nu toate virusurile care se cultivă în culturi ce-



Fig. 75 — Cultură celulară de rinichi de iepure neinoculată ($\times 200$)

lulare au o acțiune citopatogenă evidentă, iar caracterele efectului citopatic nu sînt identice la toate virusurile. Efectul citopatic este un indiciu important nu numai al demonstrării prezenței virusului în cultură, ci adesea și pentru clasificarea acestuia într-o anumită categorie. În principiu, efectul citopatic poate fi:

- a — de tip degenerativ;
- b — de tip degenerativ cu producere de incluzii;
- c — de tip proliferativ;
- d — de tip proliferativ cu producere de incluzii.

Modificările de tip degenerativ constau în micșorarea în volum a celulelor, cu tendința de rotunjire a lor, în apariția de vacuole intracitoplasmice, care, uneori, conferă citoplasmei un aspect spumos, în apariția de granulații citoplasmice, în timp ce nucleul devine și el mai redus, dînd aspectul de picnoză, de obicei cu mărirea refringenței sale.

Modificările de tip degenerativ, cu producerea de incluzii, sînt identice cu precedentele, doar că, în plus, apar niște formațiuni bine delimitate, de obicei oxifile, în număr variabil. Incluziile pot fi intracitoplasmice, intranucleare sau simultan intranucleare și intracitoplasmice. Ele sînt formațiuni oxifile de dimensiuni variabile (chiar peste 200 milimicroni), rotunde, ovale sau neregulate, adesea cu un halou în jurul lor. Astfel, virusurile rinopneumoniei ecvine, febrei catarale maligne, encefalomielitei aviare, virusul bolii lui Marek, produc incluzii intranucleare. Virusul pseudopestei aviare, virusul pestei bovine și cel al turbării produc incluzii intracitoplasmice, iar virusul jigodiei canine, atît intracitoplasmice cît și intranucleare.

Modificările de tip proliferativ constau în apariția de celule voluminoase, rezultate de obicei în urma unei diviziuni nucleare neînsoțite de diviziunea citoplasmei. Iau naștere astfel celule gigante de tip sincițial. Astfel, sînt modificările induse de virusul parainfluenței.

În cazul modificărilor de tip proliferativ cu incluzii, iau naștere în plus incluzii intranucleare. Astfel, este virusul pojarului.

Observarea apariției efectului citopatic se face prin examinarea zilnică la microscop cu o mărire de 100—150 ori a culturilor inoculate. Intervalul de timp în care apare este variabil și dependent de virusul în cauză și bogăția inoculului. Un inocul bogat în particule virale poate determina un efect citopatic evident în 24—36 ore, în timp ce unul sărac nu determină modificarea aparentă a celulelor nici după 7 zile. Unele virusuri determină apariția unui efect citopatic numai după 1—3 treceri oarbe, în culturile de pasaj, timp necesar pentru adaptarea virusului la substratul celular. O trecere oarbă se face folosind cultura integrală (mediul și celulele inoculate), preferabil după ce s-au făcut 2—3 înghețări și dezghețări, pentru a elibera virusul din celule.

Aspectul culturii în care este vizibil un efect citopatic este variabil cu tulpina de virus, care-l determină. În acest sens cîteva exemple sînt edificatoare:

— Virusurile ECHO, coxackie A₉, B₁, B₅ produc un efect citopatic asemănător: în primele 12—18 ore apare o rotunjire a unora din celule, acestea apărînd de dimensiuni mai reduse, mai întunecate, cu nucleul mai puțin distinct, unele fiind transformate într-o masă mică, retractată, amorfă. În stadiile următoare, numărul acestor celule crește progresiv, unele dintre ele desprinzîndu-se de pereții vasului și plutind în mediu.

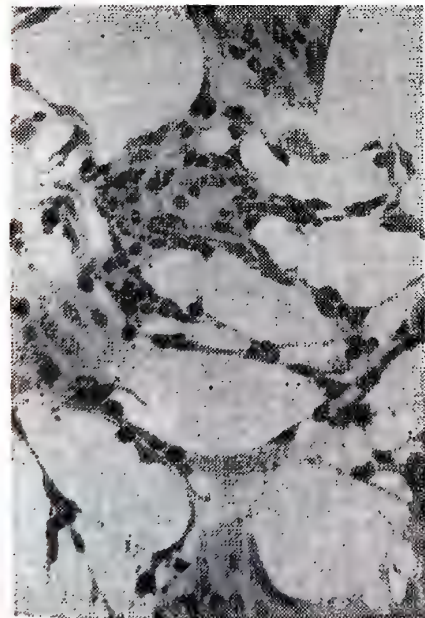


Fig. 76 — Rotunjiri celulare cu condensarea cromatinei nucleare și crearea de spații în monostat — Adenovirus ($\times 200$)

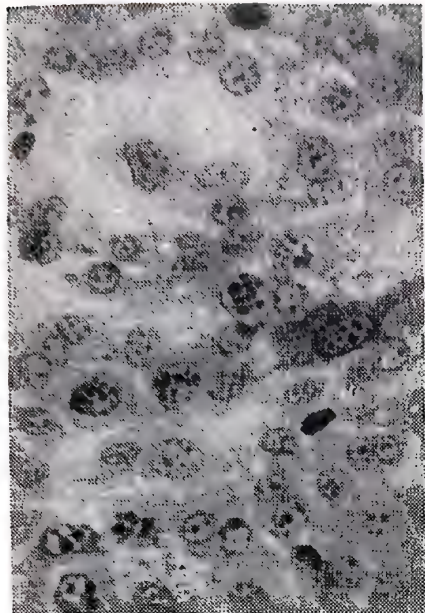


Fig. 77 — Incluzii intranucleare — Adenovirus ($\times 400$)

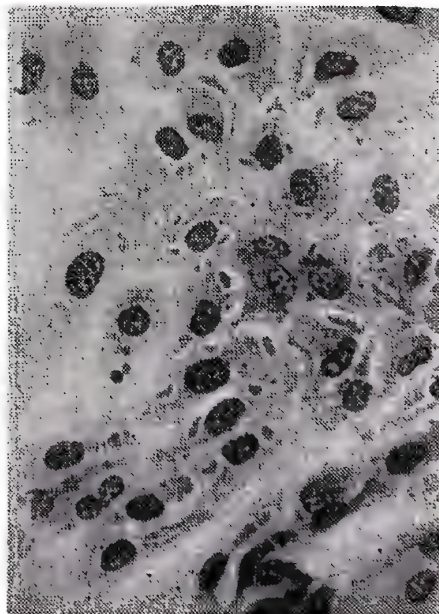


Fig. 78 — Incluzii intracitoplasmatic — virusul para-influenței ($\times 400$)

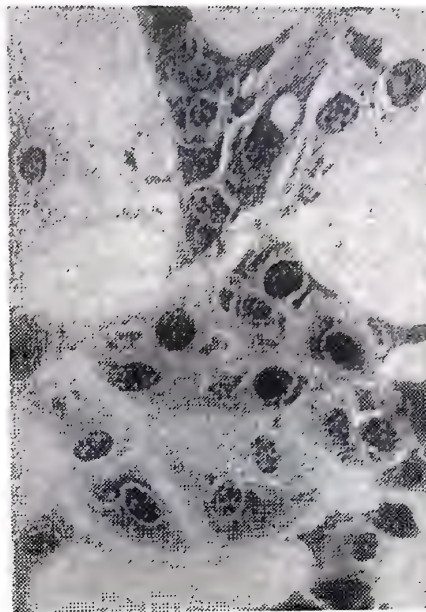


Fig. 79 — Incluzii intracitoplasmatic — virusul para-influenței ($\times 400$)

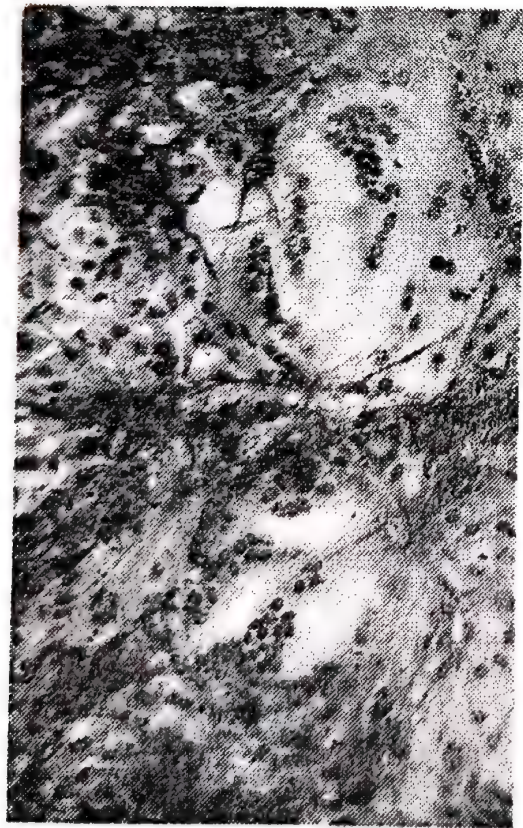


Fig. 80 — Efect citopatic indus de virusul pseudoestei aviare ($\times 80$)

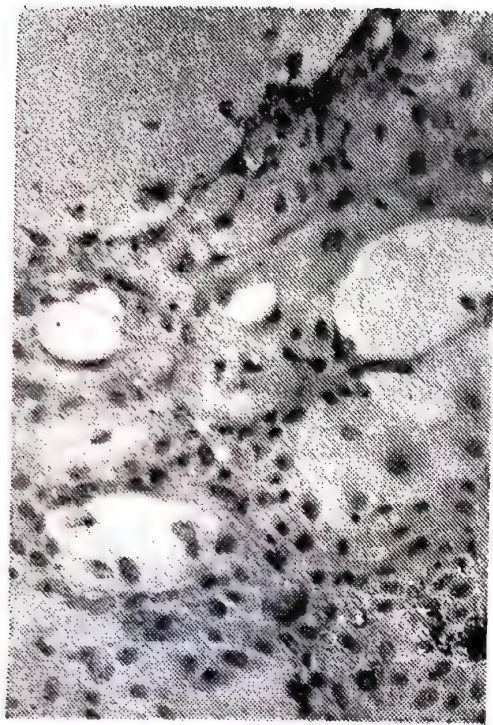


Fig. 81 — Efect citopatic indus de virusul stomatitei papuloase ($\times 200$)

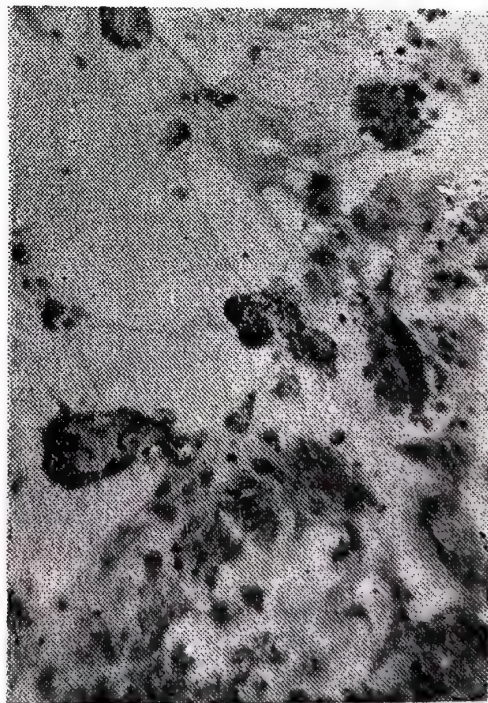


Fig. 82 — Efect citopatic indus de virusul variolei bovine (condensări și fragmentări nucleare însoțite de sincitiazări și distrugerii celulare) ($\times 200$)

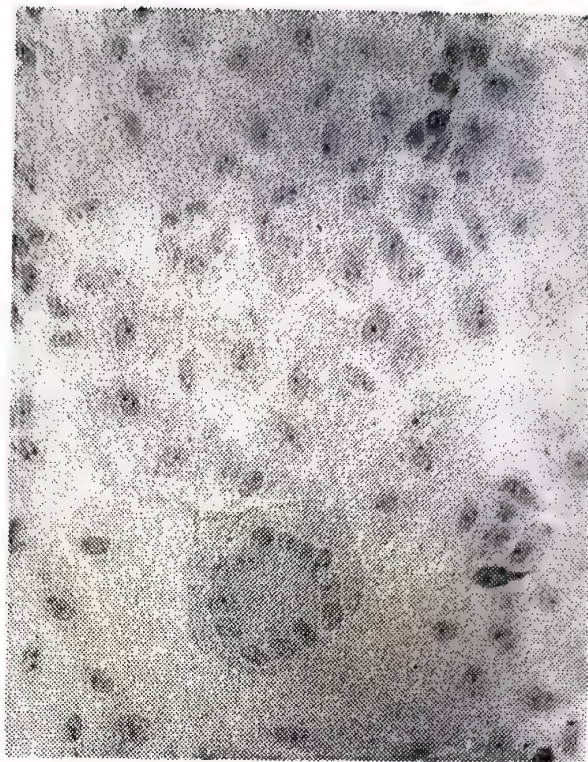


Fig. 83 — Efect citopatic indus de virusul jigodiei canine (formarea de celule gigante — $\times 400$)

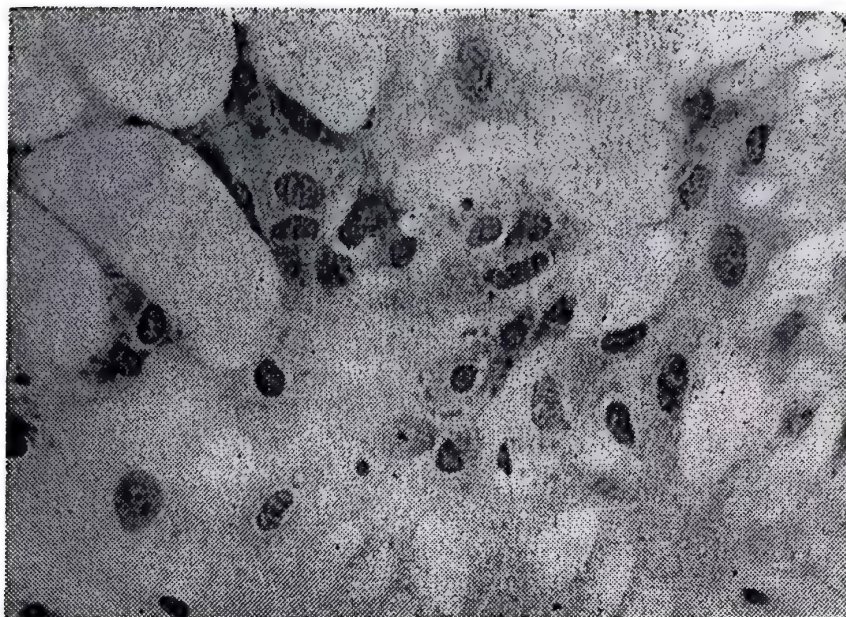


Fig. 84 — Efect citopatic indus de virusul mixomatozei iepurilor (fragmentări ale cromatinei nucleare, incluzii intracitoplasmatiche, desprinderi de celule cu vacuolizări în monostrat; $\times 400$)

În cele din urmă, din cultură nu mai rămân decât rămășițe amorfe, resturi celulare sfărâmate, ce plutesc în mediul cu aspect turbid. În cazul culturilor de tip fibroblastic, se poate produce o desprindere în masă a pinzei celulare afectate.

— Adenovirusurile și virusurile herpetice produc un efect citopatic degenerativ de tip deosebit: celulele se rotunjesc, câștigă în dimensiuni, mărindu-se de 1—2 ori, după care se adună în grupe celulare, formând ciorchine, ce duc la destrămarea pinzei celulare și determină formarea de ochiuri mari, libere de celule, în colțurile cărora se situează grămezi celulare. În cele din urmă, celulele astfel modificate devin întunecate și multe se dezlipesc de pereți. Virusul herpetic produce în plus mase citoplasmatiche întinse, în care se disting uneori nucleii (celule gigante).

— Virusul hepatitei contagioase a câinilor produce în culturi celulare renale, testiculare, hepatice, de câine dar și în unele culturi provenind de la alte specii (rinichi, pulmoni de porc, cobai, hamster și maimuță), începând cu a doua zi de la inoculare, procese degenerative cu apariția de incluzii intranucleare. Cu ajutorul anticorpilor fluorescenți și al cercetărilor citochimice s-a stabilit că aceste incluzii conțin antigen viral în concentrații ridicate. Ele nu reprezintă altceva decât conglomerate de particule virale.

— Virusul bolii mucoaselor produce în culturile primare de rinichi sau testicul de vițel, focare cu celule având citoplasma vacuolizată, granulară sau condensată, iar nucleul puternic picnotic.

— Virusul parainfluenței bovine determină rotunjirea celulelor însoțită de formarea de sinciții, respectiv celule gigante. În celule, atât intracitoplasmatic cât și intranuclear, se găsesc incluzii oxifile.

— Virusul spumos al maimuțelor, virusul parotiditei epidemice și altele determină sincițializarea celulelor, manifestată prin formarea de mase citoplasmatiche multinucleate, rezultate din contopirea mai multor

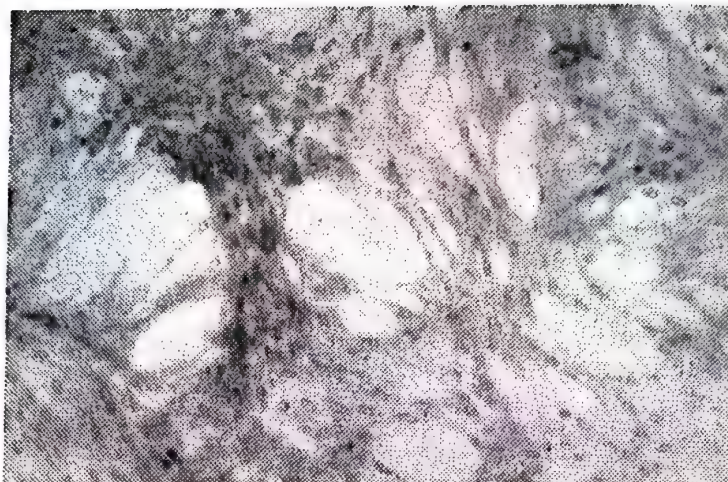


Fig. 85 — Efect citopatic indus de mixovirus ($\times 80$)

celule sau din multiplicarea nucleară neînsoțită de clivaj citoplasmatic. Pe lângă aceste sinciții giganto-celulare se formează și grămezi amorfe, de aspect întunecat, înconjurate de zone libere, lipsite de celule.

Alte virusuri (vaccinal) produc efecte citopatice de aspect mixt în care se întâlnesc toate 3 tipurile de fenomene. Capacitatea citopatogenă este variabilă chiar în cadrul aceleiași specii de virus, cu tulpina și chiar cu condițiile de cultivare. Efectul citopatic reprezintă totuși mijlocul cel mai rapid și expeditiv de orientare în diagnostic.

Modificările monostratului celular, ca urmare a multiplicării virusurilor, trebuie diferențiate de modificările ce se pot produce datorită fenomenelor de îmbătrânire a celulelor sau efectului citotoxic al unor componente din mediul nutritiv (serul, unele ingrediente impure etc.).

Punerea în evidență a modificărilor morfologice din culturile celulare. Examinarea preparatelor native sau direct a tuburilor de cultură

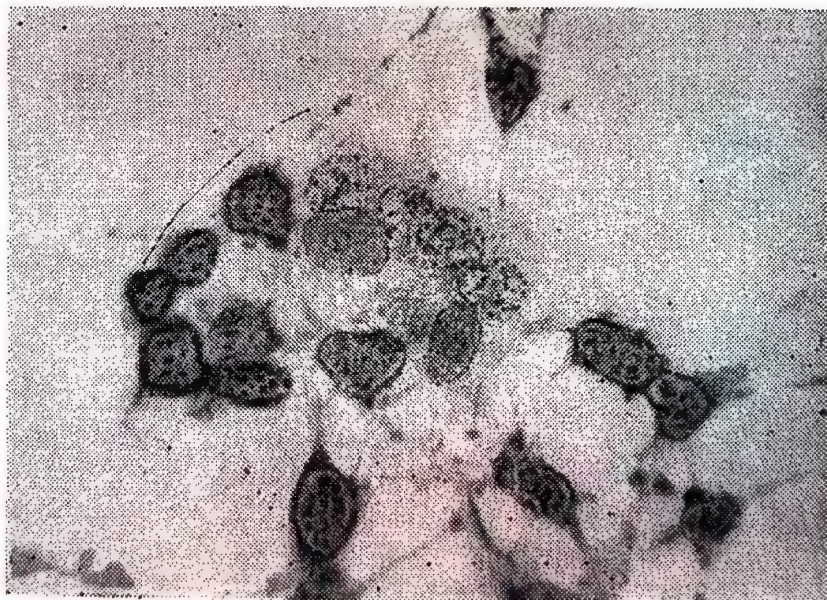


Fig. 86 — Efect citopatic indus de virusul bolii lui Aujeszky (crearea de spații în monostrat, condensări și pulverizări ale cromatinei nucleare; $\times 400$)

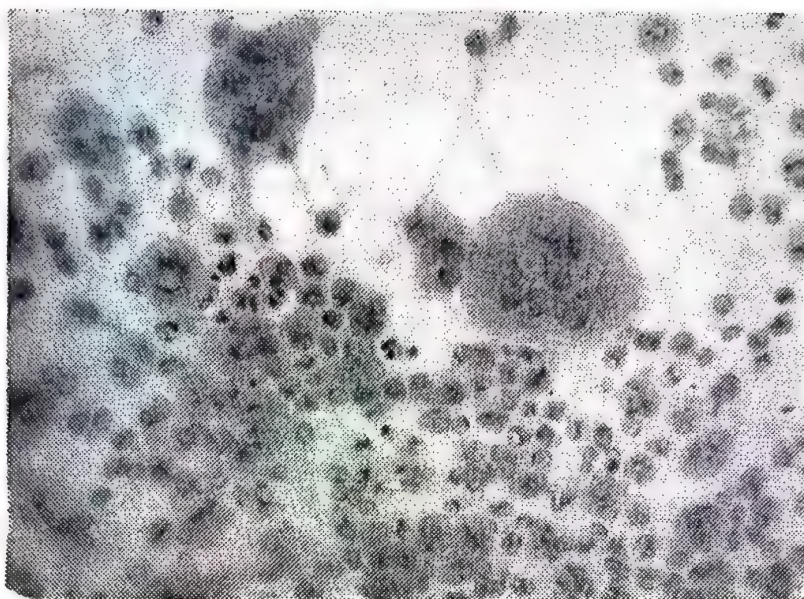


Fig. 87 — Efect citopatic indus de virusul bolii lui Aujeszky (sincițializări cu formarea de celule gigante, condensări ale cromatinei nucleare, crearea de spații în monostrat; $\times 200$)

permite observarea unor modificări cum ar fi rotunjirea celulelor, apariția lacunelor în monostratul celular, desprinderea celulelor de pe pereții vasului, dar pentru a cerceta mai îndeaproape alterațiile citoplasmatice și nucleare care survin în cursul interacțiunii dintre virus și celula gazdă, sînt preferate metodele de colorare.

O metodă care oferă rezultate foarte bune este următoarea:

- se varsă lichidul nutritiv din tubul de cultură și se toarnă alcool metilic în cantitate suficientă pentru a acoperi toată cultura (2—3 ml); se lasă în contact cîteva minute în poziție înclinată;
- se îndepărtează alcoolul metilic și se spală tubul cu acetonă;

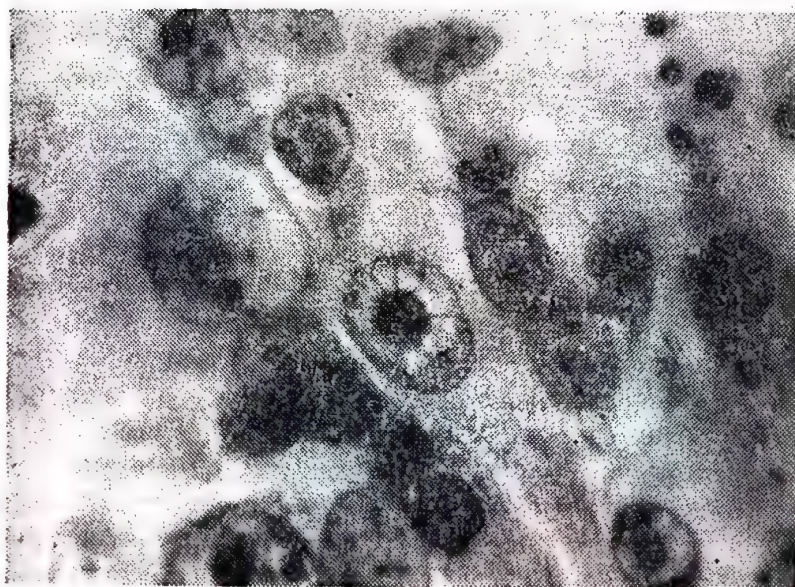


Fig. 88 — Modificări nucleare induse de adenovirus (condensări și fragmentări ale cromatinei nucleare, picnoze; $\times 400$)

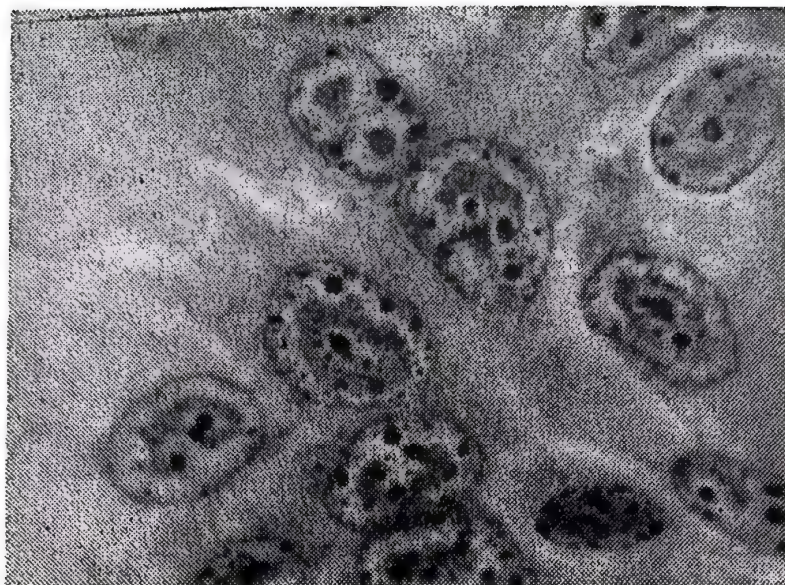


Fig. 89 — Efect citopatic indus de herpes virus — conjunctivă de bovine (pulverizări ale cromatinei nucleare; $\times 900$)

— imediat după tratarea cu acetonă (în așa fel ca cultura să nu se usuce), se tratează cu amestec de alcool etilic absolut și eter (în proporții egale), în cantitate de 4—5 ml pentru o eprubetă; se lasă 5—10 minute în repaus după care se înlătură;

— se toarnă apoi, tot înainte de a se usca cultura, o soluție de 8% în alcool și eter, celoidină (4—5 ml) și se omogenizează pe tot perețele eprubetei în așa fel încât să formeze un strat uniform;

— excesul se înlătură;

— se răsuțește eprubeta (fără dop) câteva minute pentru ca stratul de celoidină să fie cât mai uniform și apoi se pune cu gura în jos pentru a se usca complet (timp de 20 minute); se toarnă apoi în eprubetă apă distilată, ca pelicula de celoidină să nu devină fragilă;

— cu o pensă se desprinde pelicula de celoidină de pe pereții eprubetei, aceasta antrenând totodată și stratul de celule; în final pelicula va avea aspectul unui sac transparent și moale; se taie partea laterală și cea inferioară cu o foarfecă și se lipește foiața ce rezultă pe o lamă de microscop curată, pe care în prealabil s-a pus puțină apă distilată; lipirea se face cu partea care a aderat la perețele eprubetei; apa de pe lamă ușurează întinderea perfectă a peliculei; cu o sugativă se usucă excesul de apă;

— se pun apoi, cu o baghetă, câteva picături de *oleum cariophili*, întinzându-se uniform cu degetul pelicula de celoidină. Acesta are rolul de a fixa bine monostratul de lamă;

— urmează 3 băi de alcool absolut și eter în părți egale în care se lasă 10—20 minute pentru dizolvarea stratului de celoidină;

— se trece apoi preparatul într-o baie de alcool 76° timp de 5—10 minute, după care urmează o baie de apă distilată (20 minute) și colorarea.

Colorarea se face de preferință bicromic:

— hematoxilină — 10 minute

— apă de robinet pînă la virarea spre albastrui a monostratului celular

- eozină 1—2 minute, urmată de clătire în apă distilată
- o baie de alcool 70° urmată de 4 băi de alcool 96°
- o baie de xilol
- montare în balsam de Canada
- examinare la microscop.

Se poate face colorarea și direct în tubul de cultură. În acest scop, se face întâi fixarea cu formol 1/4 timp de 24 ore. Se spală apoi cu apă distilată și se colorează bicromic:

- hematoxină 10—30 minute
- spălare cu apă de robinet 15—30 minute
- eozină 5 minute
- spălare în apă distilată
- spălare în alcool 96°
- baie de alcool absolut 10 minute
- baie de alcool + xilol (circa o oră)
- montare în balsam de Canada.

Nucleii vor apărea colorați în albastru-închis, iar citoplasma în roz-violet.

După altă tehnică, pentru a colora monostratul celular în care urmează să se cerceteze modificările antrenate de dezvoltarea virusurilor, se recurge la cultivarea acestora în tuburi speciale de cultură cunoscute sub numele de tuburi Barski sau Leighton. Acestea au partea inferioară modificată, dispunînd de un perete plat pe o lungime de cca 3,5 cm. În aceste eprubete, se introduce de la bun început o lamelă de sticlă, care va ocupa în cursul dezvoltării monostratului partea aplatizată a tubului, constituind suportul de dezvoltare al acestuia. În momentul cînd cultura este dezvoltată suficient, se inoculează întocmai ca și în cazul celorlalte tuburi și se urmărește apariția modificărilor celulelor antrenate de virus.

În vederea colorării se procedează în felul următor:

- se decantează lichidul de cultură din tub, se înlocuiește cu soluție fiziologică, se pune 10 minute la termostat;
- se aruncă soluția fiziologică și se pune în loc fixatorul Dubosq sau un amestec, în părți egale, de alcool absolut și eter, menținîndu-se 24 de ore;

— se aruncă amestecul de alcool și eter, înlocuindu-se după 10—15 minute cu alcool 80°, care, la rîndul lui, se înlocuiește după 10 minute cu alcool 70°, apoi cu alcool 60° și în fine alcool 50°;

— după ce se aruncă ultimul alcool de spălare, lamela se desprinde și se scoate din tub;

— se introduce în hematoxină diluată (7 picături hematoxină de bază la 10 ml apă distilată) și se ține timp de 24 de ore, sau hematoxină în soluție concentrată (de bază), în care se ține 5 minute;

— spălare cu apă distilată;

— baie de alcool acidulat, pînă ce culoarea monostratului devine roz-pal (alcoolul acidulat se prepară din 100 ml alcool 70° + 1 ml acid clorhidric p.a. normal; înainte de folosire din această soluție se prepară soluția de lucru, amestecînd o parte soluție de bază cu 2 părți alcool 80°);

— baie cu apă amoniacală, timp de 3—4 minute, după care culoarea virează ușor spre albastru (apa amoniacală se prepară din 100 ml apă de robinet la care se adaugă 5 picături de amoniac; din această soluție de bază, se prepară soluția de lucru, prin amestecarea cu două părți de apă de robinet);

- baie cu apă de robinet timp de 6 minute;
- baie cu eozină timp de 30 secunde;
- 3 băi de alcool 96°, în care se trece foarte rapid;
- baie de alcool absolut;
- baie de alcool + xilol (\overline{aa});
- xilol;
- montare pe lamă curată în balsam de Canada.

3 — *Formarea de plaje sub agar*. În studiul efectului citopatic al diferitelor virusuri s-a observat că dacă inoculul virulent este foarte diluat, efectul citopatic în mediile lichide se produce în salturi. Cele câteva celule infectate inițial vor elibera o cantitate de particule virale care vor infecta alte celule, fie prin intermediul mediului nutritiv, fie prin contiguitate, ușurând în acest fel o nouă fază de sinteză a virusului, soldată cu punerea în libertate a unei noi cantități de virus care va infecta restul celulelor. Dacă se întrerupe posibilitatea ca celulele rămase intacte la un anumit moment dat să fie infectate de către corpusculii virali prin intermediul lichidului de cultură, acoperind cultura, imediat după inoculare, cu un strat de agar nutritiv special, focarele de degenerare vor fi localizate și evoluția lor se va face în continuare numai din aproape în aproape. Celulele din aceste focare, degenerate în urma acțiunii virusului, își pierd proprietatea de a fixa un colorant vital ca roșul neutru, înglobat în agar sau adăugat ulterior și, în acest fel, vor apărea așa-numitele „plaje”, de aspect translucid, necolorate. Fenomenul a fost descoperit de Dulbecco în 1952.

Tehnica constă în următoarele:

- se decantează mediul de pe monostratul complet format în flacoane de 85 ml. Se spală de 3 ori cu soluție SST (cîte 2 ml);
- se prepară diluții zecimale în SST și se însămânțează fiecare flacon cu cîte 0,5 ml suspensie virală;
- se incubează o oră la 37°C pentru absorbție;
- se amestecă 15 ml mediu cu 20% ser de cal în SST sau în mediu de întreținere conținând 0,004% roșu neutru, cu un volum egal de agar 3% în SST (agaroza) topit prin încălzire la 100°C și răcit înainte de amestec la 43°C;
- se acoperă rapid monostratul cu 4 ml din amestecul de agaroză și se lasă să se solidifice perfect orizontal;
- se inversează flaconul și se incubează la 37°C;
- se examinează zilnic în lumină oblică pe un fond alb sau verzui-deschis.

După aspectul și timpul de apariție a plajelor în agar se pot trage o serie de concluzii foarte utile pentru precizarea diagnosticului. În timp ce unele virusuri (poliomielitic, coxsackie) determină apariția relativ precoce (în 2—3 zile) a plajelor, acestea avînd un contur rotund, bine delimitat, diferitele tipuri de virus ECHO produc plaje mai tardiv (după 3—10 zile), unele cu margini difuze, din cauza persistenței unor celule normale.

Metoda are aplicații deosebit de utile în studiile de genetică virală; ea permite izolarea de linii pure de virus, pornind de la o singură „colonie” care este generată, cel puțin teoretic, de către o singură particulă virală. De asemenea, ea se folosește în operațiunile de titrare a concentrației virusurilor în diferite suspensii virale.

Ea se folosește și în izolarea unor tulpini virale cu însușiri particulare. Astfel, în cazul virusului Aujeszky s-a observat că tulpinile generatoare de plaje mici, deci care au o capacitate de „difuziune” lentă în monostratul celular, sînt dotate cu însușiri de patogenitate redusă, fără a-și modifica însă valoarea antigenică. Izolarea unor astfel de tulpini a stat la baza preparării virus-vaccinului antiaujeszky viu care se folosește în unele țări cu rezultate foarte bune.

Metode indirecte

1 — *Testul de hemadsorbție*. Spre deosebire de virusurile care provoacă efectul citopatic în culturile celulare, există și virusuri care, nu produc un efect vizibil, deci prezența lor nu se poate stabili pe baza acestuia. Constatîndu-se că unele virusuri au capacitatea de a determina celulele în care se dezvoltă, de a adsorbi la suprafața lor hematiile dintr-o suspensie ce se adaugă în tubul de cultură, s-a imaginat testul de hemadsorbție. Fenomenul este vizibil la microscop și poate fi inhibat în mod specific prin serul imun corespunzător. Se pot folosi hematii de cobai, iepuri, oaie, om (grup 0) etc. În acest scop se adaugă în tubul de cultură, fie că apare sau nu efectul citopatic, o suspensie de hematii 0,40% spălate temeinic. După 3—5 minute, examinarea la microscop permite constatarea prezenței hemadsorbției în cazul cînd în cultură s-a dezvoltat virusul avînd această însușire. În stadii avansate cînd hemadsorbția este totală, hematiile tapisează tot stratul de celule, totodată observîndu-se grămezi aglutinate care plutesc libere în mediu. Spre deosebire de efectul citopatic care nu apare constant la primul pasaj, acesta apare întotdeauna dacă este vorba de un virus hemadsorbant. Exemple de virusuri hemadsorbante sînt virusul Newcastle, al influenței, al parainfluenței, al oreionului, ECHO 10.

2 — *Testul de viabilitate*. Presupune determinarea capacității de proliferare a celulelor puse în contact cu un virus, în condiții propice de multiplicare. Metoda este mai puțin folosită.

3 — *Testul de coalescență* se bazează pe constatarea că două fragmente de țesut viabil puse în contact strîns într-un mediu nutritiv formează prin proliferarea celulelor, o singură masă — fenomen numit coalescență. Celulele care au fost infectate nu mai realizează contopirea. Metoda este greoaie. S-a folosit în cazul virusului encefalomielitei ecvine de vest.

4 — *Interferența* se bazează pe acțiunea antagonică dintre două virusuri, dintre care unul (virusul interferent) conferă celulei gazdă proprietatea de a nu fi receptivă față de un al doilea virus. De obicei folosește în sistem un virus hemadsorbant pentru a ușura punerea în evidență a fenomenului de interferență.

5 — *Testele biochimice* presupun punerea în evidență a diminuării sau creșterii cantității unor compuși celulari sau ai mediului, ca urmare a cultivării unui virus. Astfel, sînt consumul de glucoză, modificările proteinelor celulare etc.

Inocularea ouălor embrionate de găină

Folosirea ouălor embrionate a luat o extindere mare, în special după 1930, când GOODPASTURE a semnalat valoarea acestei metode pentru izolarea virusurilor. Pentru izolarea primară a unor virusuri, inocularea pe ouă embrionate este cea mai sensibilă metodă. De asemenea, se folosește larg în prepararea unor antigene cu titruri ridicate ca și a unor vaccinuri. Avantajele constau în următoarele:

- se manipulează ușor;
- nu ocupă spațiu mare;
- fluidele și membranele embrionare furnizează cantități mari de material virulent;
- în embrioni nu se formează, după inoculare, anticorpi față de agentul inoculat;
- lichidele embrionare sînt relativ libere de proteine, pretîndu-se pentru obținerea de vaccinuri.

Dezavantaje:

- ouăle pot conține unii agenți virali sau bacterieni transmiși de la păsările adulte (virusul leucozei, virusul encefalomielitei aviare, pseudopestei aviare, agentul ornitozei, micoplasme). Prezența lor în stare latentă poate produce interferență care denaturează rezultatele inoculărilor;
- ouăle provenite de la păsări tratate cu antibiotice din grupul tetracinelor pot condiționa o rezistență a embrionilor respectivi mai ales față de unele rickettsii și chlamidii.

Embrionii de găină în primele 10 zile de incubație au nivelul metabolic cel mai ridicat, din cauza proliferării celulare intense, iar țesuturile nefiind diferențiate, susceptibilitatea la infecție este uniformă. Proliferarea virusului atinge și ea rate înalte în aceste stadii. Între a 10-a și a 15-a zi, metabolismul embrionului scade, iar diferențierea țesuturilor atrage după sine și o susceptibilitate selectivă a lor, cu producerea de leziuni tipice. În stadiul final, embrionul primește o rezistență nativă față de agenții care nu sînt în mod obișnuit patogeni pentru specia respectivă.

Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească ouăle care urmează să fie folosite pentru inoculări:

- să fie libere de virusurile pseudopestei aviare, encefalomielitei, bronșitei infecțioase, leucozei, bolii lui Marek, de micoplasme sau diferite bacterii (*Salmonella pullorum* de exemplu);
- să provină de la găini care nu au fost tratate cu tetraciline;
- să fie incubate în condiții corespunzătoare (37°C, cu 40—70% umiditate) și să fie asigurată mișcarea lor periodică prin schimbarea poziției cu scopul de a preveni aderențele membranelor.

Căile de inoculare diferă cu natura agentului viral ce urmează a fi inoculate și cu scopul în care se inoculează (izolarea primară, preparare de antigeni virali, determinarea capacității infective etc.).

Înainte de inoculare ouăle se mirează, notîndu-se cu creionul pe coajă, poziția embrionului și nivelul camerei de aer. Apoi ele se transportă în boxa sterilă, se așază pe stativ speciale, care să permită orientarea lor în poziția dorită, avîndu-se grijă ca pentru fiecare probă să existe mai multe ouă (în general 5). Se badijonează porțiunea cores-



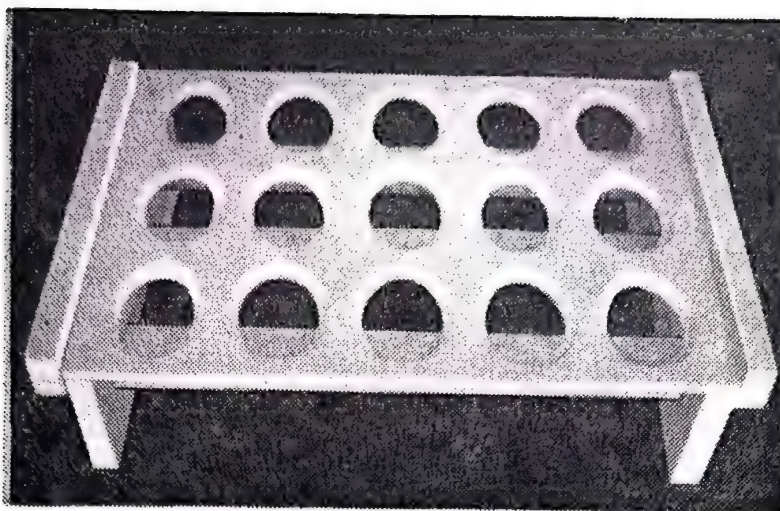


Fig. 90 — Stativ pentru ouă

punzătoare camerei de aer cu un tampon cu tinctură de iod și se lasă să se usuce, după care urmează inocularea. Aceasta se face cu ace și seringi sterilizate prin fierbere.

1 — *Calea corioalantoidiană* (metoda Burnet) se folosește mai des pentru virusurile grupei pox (variolice), unele herpes-virusuri și virusul Newcastle, care produc leziuni caracteristice pe membrana corioalantoidiană. Se pretează foarte bine pentru determinări cantitative.

Dacă unele virusuri, cum sînt cel al variolei aviare, virusul laringotraheitei aviare, al bolii lui Aujeszky, al mixomatozei, al sarcomului Rous, provoacă leziuni sub forma unor focare vizibile macroscopic, altele provoacă leziuni foarte discrete (virusul influenței A și B), iar altele, deși se multiplică, nu provoacă modificări decelabile macroscopic (virusul rabic, al coriomeningitei limfocitare etc.).

La embrionii de 10—11 zile se marchează prin ovoscopie locul cel mai puțin vascularizat, în apropierea sacului de aer (de obicei este în partea opusă embrionului). Oul se fixează într-un stativ cu partea marcată în sus și se badijonează cu tinctură de iod suprafața respectivă

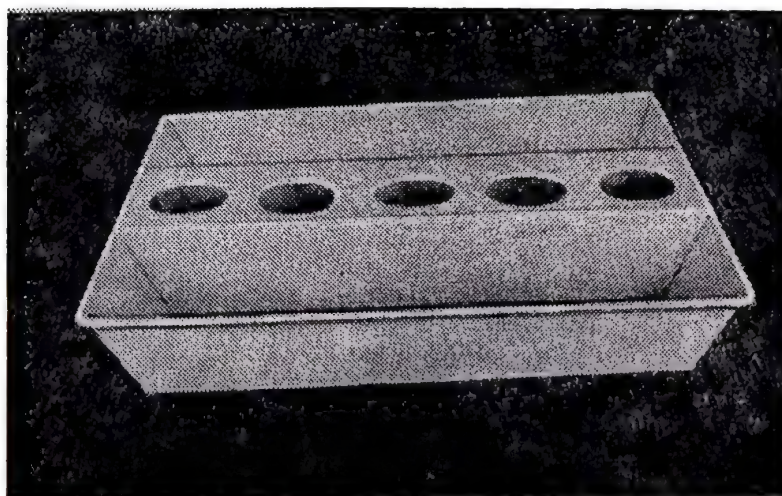


Fig. 91 — Tavă pentru deschiderea ouălor incubate

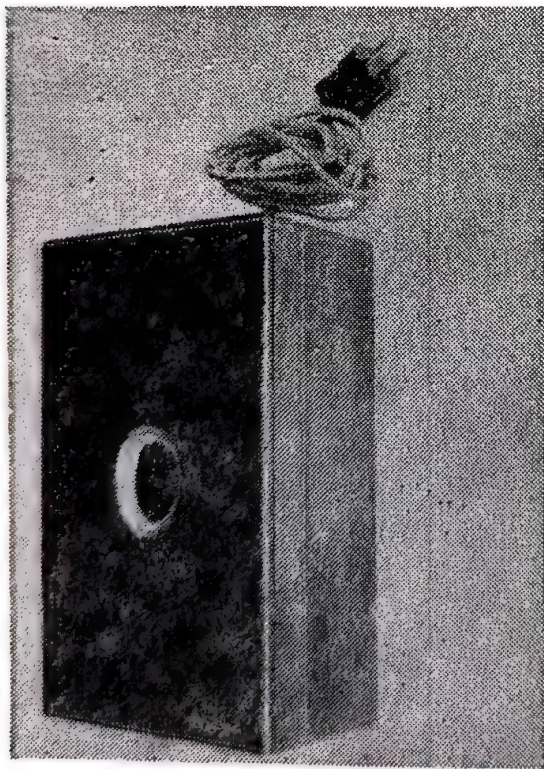


Fig. 92 — Ovoscop

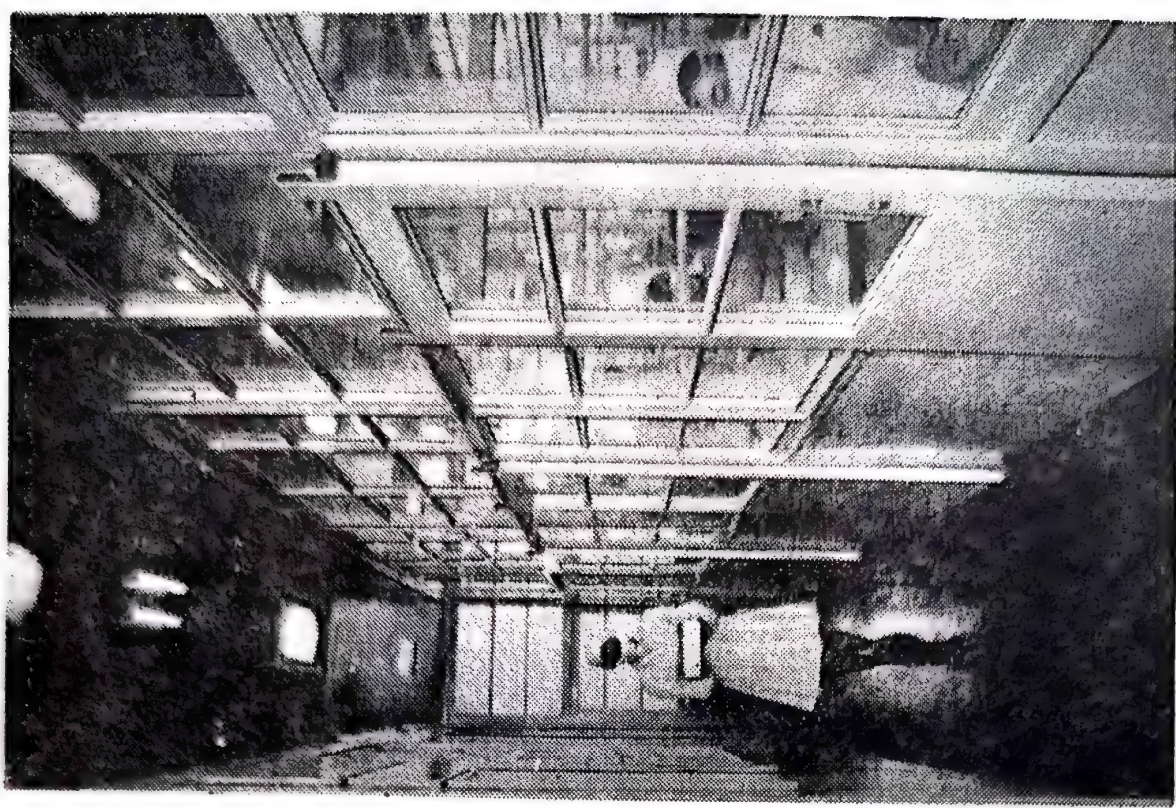


Fig. 93 — Boxe sterile pentru inoculări

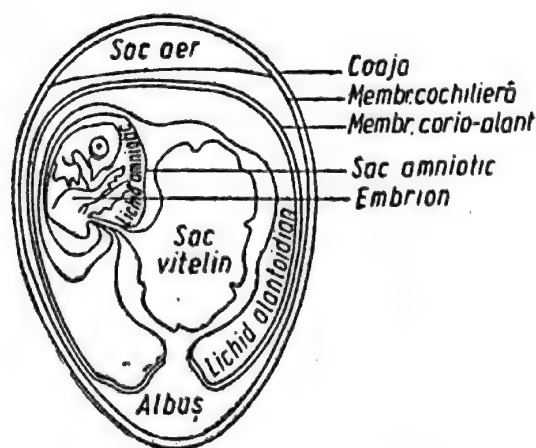


Fig. 94 — Schema componentelor oului embrionat de găină

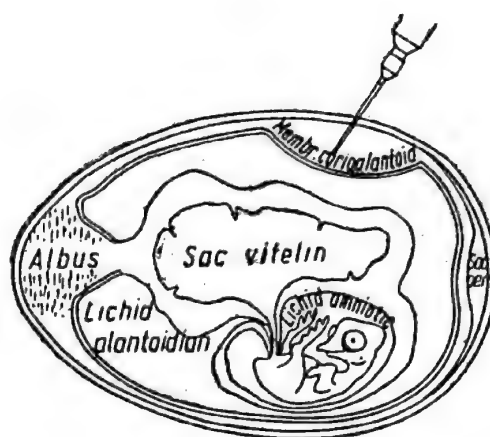


Fig. 95 — Inocularea în membrana corioalantoidiană a oului embrionat de găină

și o parte din aceea corespunzătoare camerei cu aer. Cu un dispozitiv special, de tipul frezei dentare, se perforază coaja în dreptul camerei de aer. Cu aceeași freză, la care se adaptează un disc de carborund, se creează la nivelul marcajului un orificiu dreptunghiular cu dimensiunile de 3/6 mm în coaja oului, în lungul axului mare al acestuia. Se va avea grijă ca membrana cochilieră să nu fie perforată. Prin evacuarea aerului din camera de aer, se creează o depresiune (un fals sac cu aer) la nivelul „ferestrei”, unde cu ajutorul unei seringi se va depune inoculul (0,1 ml), prin perforarea membranei cochiliere pe o distanță de cca 6 mm (nu însă și a celei corioalantoidiene). Cele două orificii se etanșeizează apoi cu ajutorul parafinei sau colodiului (în cazul ferestrei se aplică o lamelă de microscop și parafină sau colodiu pe margini). Incubația se face în poziție orizontală la 35°C timp de 48—72 de ore.

Înainte de recoltarea membranei corioalantoidiene, se face ovoscopia pentru a vedea dacă camera de aer mai este sau nu deplasată. Dacă nu, se face o ușoară aspirație la nivelul orificiului camerei de aer. Locul din dreptul falsului sac de aer se badijonează cu tinctură de iod după care se sparge coaja și membrana cochilieră cu ajutorul unei foarfeci și se îndepărtează, expunându-se membrana corioalantoidiană pe o suprafață cât mai mare. Porțiunile de membrană prezentând leziuni specifice se prelevează în recipiente sterile pentru examinări ulterioare.

2 — *Calea alantoidiană* se folosește pentru pasajul virusurilor, pentru producerea de cantități mari de virus, pentru reacțiile serologice și pentru prepararea vaccinurilor. Virusul proliferază în celulele endodermice ale membranei corioalantoidiene și este eliberat în cantități mari în fluidul cavității alantoidiene.

Ouăle embrionate de 10—11 zile sînt marcate în locul unde se află embrionul și camera de aer, punctul de inoculare fiind în partea opusă embrionului, la limita sacului cu aer, într-o zonă unde vascularizația este mai puțin intensă. După perforarea cojii oului și dezinfecția de rigoare, se străpunge cu acul adaptat la seringă și orientat în direcție paralelă cu axul lung al oului pe o distanță de circa 13 mm membrana cochilieră și corioalantoidiană, inoculîndu-se 0,1—0,2 ml în cavitatea alantoidiană. După parafinarea orificiului, ouăle se pun din nou la incubație și se

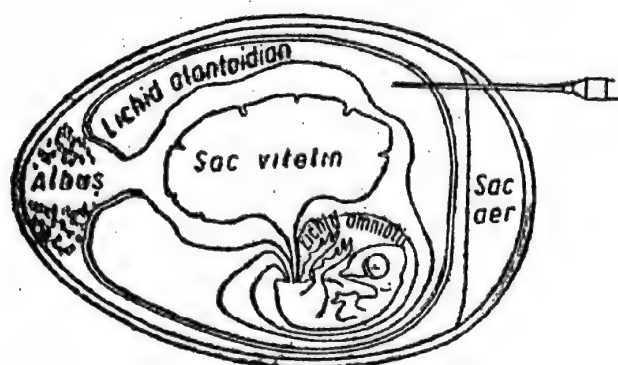


Fig. 96 — Inocularea în cavitatea corioalantoidiană

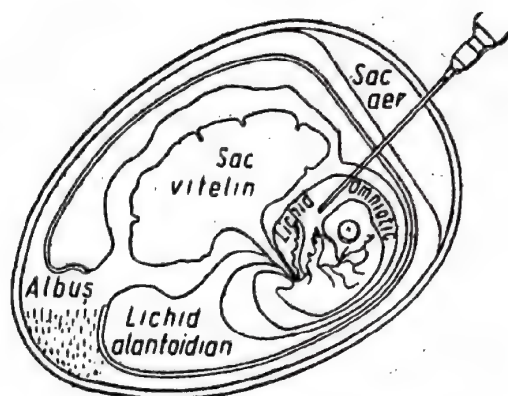


Fig. 97 — Inocularea intraamniotică

mirează zilnic. Pentru recoltarea lichidului alantoidian, ouăle se refrigerază la $+4^{\circ}\text{C}$, se deschid apoi cu instrumente sterile în dreptul sacului aerian, se perforază membrana corioalantoidiană și se aspiră cu pipeta sau cu o seringă lichidul.

3 — *Calea amniotică* este o cale foarte sensibilă pretindu-se la izolări de virusuri din materiale patologice primare. Virusul introdus în cavitatea amniotică este ingerat de embrion și va fi multiplicat în țesuturile acestuia. Se pretează foarte bine pentru cultivarea virusurilor influenței și laringotraheitei păsărilor. Se folosesc, în general, embrioni de 10—12 zile, dar se pot folosi și embrioni mai tineri, pentru virusuri care se multiplică mai încet. Acul se introduce în direcția embrionului (poziția lui fiind marcată în prealabil prin ovoscopie) prin sacul de aer, pe o distanță de cca 30 mm. Străpungerea membranei amniotice este indicată de mișcarea embrionului simțită prin ac. Inoculul este de 0,1—0,2 ml și se depune în cavitatea amniotică. Recoltarea interesează în special embrionul și lichidul amniotic și se face după îndepărtarea lichidului alantoidian, după tehnica descrisă anterior.

4 — *Calea intravitelină* se folosește mai mult pentru izolarea și cultivarea rickettsiilor, a virusurilor grupei *Herpes simplex*, a virusului limbii albastre a oilor etc. Se folosesc embrioni în vîrstă de 5—6 zile, la care sacul vitelin este mai voluminos, iar celelalte învelitori embrionare nu sînt încă prea dezvoltate. Acul va trece prin camera de aer, paralel cu axul longitudinal al oului, pe o distanță de cca 25—30 mm.

După incubația necesară multiplicării agentului respectiv, se procedează la recoltarea sacului vitelin.

Unele virusuri se cultivă bine indiferent de calea de inoculare folosită. Astfel virusul pestei aviare clasice, al encefalomielitelor ecvine, virusul Aujeszky, virusul Newcastle, se pretează la inocularea pe oricare din căile enumerate.

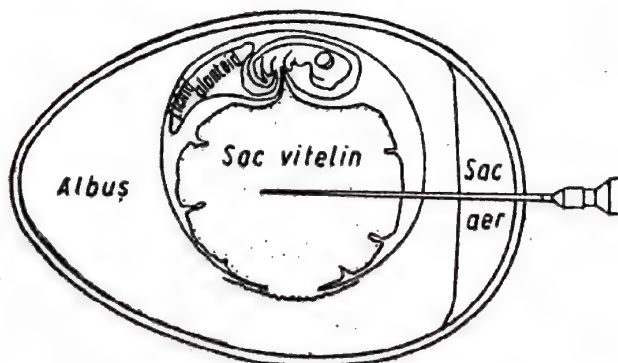


Fig. 98 — Inocularea intravitelină

Unii agenți virali și rickettsieni pot fi cultivați pe membrana vite-lină sau corioalantoidiană și după o prealabilă îndepărtare a embrionului. Adăugarea unor lichide nutritive corespunzătoare ar permite celulelor acestor membrane să-și continue procesele metabolice, virusul crescînd cantitativ.

Deschiderea ouălor embrionate inoculate se face după scurgerea unei perioade de timp de la inoculare, cînd, sub acțiunea patogenă a virusului, se produce moartea embrionului sau cînd se apreciază că în lichidele și învelitorile embrionare cantitatea de material viral a atins o anumită concentrație optimă, putînd fi recoltat. În acest din urmă caz, pentru omorîrea embrionilor, ouăle se pun la frigider la $+4^{\circ}\text{C}$ înainte de a fi deschise. Pentru deschiderea propriu-zisă, se procedează astfel:

- ouăle se transportă în boxa sterilă, se așază pe stativ speciale cu dopul de parafină (locul de inoculare) în sus;
- se badijonează întîi cu alcool și apoi de două ori cu tinctură de iod;
- se taie coaja în jurul bazei camerei de aer, cu o foarfecă sterilizată prin fierbere și flambată scurt ex tempore;



Fig. 99 — Deschiderea ouălor embrionate de găină

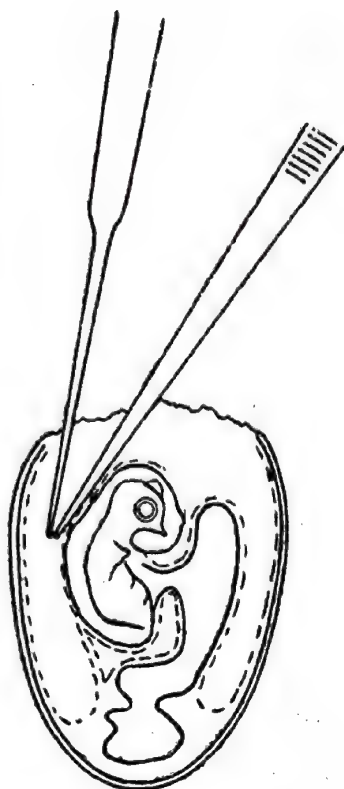


Fig. 100 — Recoltarea lichidului alantoidian

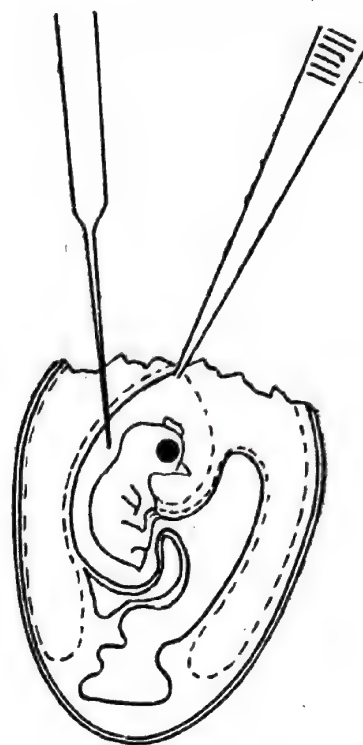


Fig. 101 — Recoltarea lichidului amniotic

— se sparge membrana cochilieră cu instrumente sterilizate în condiții de strictă asepsie, se recoltează apoi partea care interesează; se recomandă ca foarfecele și pensa care se folosesc pentru deschidere, să fie schimbate după fiecare ou.

a) Recoltarea lichidului alantoidian:

— se ridică membrana cochilieră, punându-se în evidență în acest fel membrana corioalantoidiană; se incizează cu o foarfecă sterilă;

— cu o pipetă cu bulă se aspiră lichidul alantoidian, apăsând concomitent cu pensa embrionul, pentru a evita astuparea pipetei cu membrana corioalantoidiană.

Lichidul recoltat, în cantitate de 6—8 ml, este de culoare gălbuie și se pune în eprubete sterile, însămânțându-se totodată o cantitate de 0,1—0,2 ml pe medii obișnuite de cultură pentru control bacteriologic. Când se recoltează în serie, de la un număr mare de ouă, deci cantități mari de lichid, pipetarea fiind greoaie este indicat să se recurgă la recoltarea cu ajutorul unei pipete, racordate prin tub de cauciuc la un flacon, conectat la rândul lui la o trompă sau pompă de vid (balon Erlenmayer cu dop de cauciuc străpuns de două tuburi din care unul duce la pipetă celălalt la trompă).

b) Recoltarea lichidului amniotic: după recoltarea lichidului alantoidian se prinde sacul amniotic cu o pensă fină și se puncționează cu o pipetă, aspirându-se lichidul din sac. Se pot recolta în acest fel 2—3 ml lichid amniotic care apare limpede și incolor.

c) Recoltarea embrionului și sacului vitelin: după secționarea membranei corioalantoidiene, embrionul se prinde cu o pensă și se scoate din ou secționându-se pediculul omfalic.

Pentru recoltarea sacului vitelin se varsă conținutul oului într-o placă Petri sterilă, după care, prin secționare, se lasă să se scurgă conținutul sacului vitelin și acesta se trece într-o altă placă sterilă și se spală cu soluție fiziologică sterilă.

d) Recoltarea membranei corioalantoidiene: oul se așază vertical sau orizontal, în funcție de calea de inoculare, se secționează coaja în dreptul camerei de aer și se scoate conținutul oului (embrionul, sacul vitelin etc.) reținând membrana corioalantoidiană cu pensa. Aceasta se detașează de membrana cochilieră și se pune într-o placă Petri. Pentru examinarea membranei se poate pune în placa respectivă soluție fiziologică sau amestec de soluție fiziologică și ser de cal.

După ce au fost recoltate lichidele și țesuturile care interesează, resturile de ou se pun în găleți închise și se transportă la autoclav pentru sterilizare. Capacele de ou, cojite, ce rezultă din manipulările legate de această operațiune, se pun în borcane cu sublimat, existente în boxa sterilă unde se lucrează.

Toate aceste lucrări este recomandabil să se efectueze de către personal calificat și protejat corespunzător, mai ales când este vorba de virusuri patogene (ochelari de protecție, măști faciale etc.).

Pasajele de virus pe embrioni de găină se fac cu scopul de a asigura păstrarea și verificarea în timp a patogenității virusurilor pentru embrioni de găină.

În acest scop, materialele virulente (lichide, învelitori) păstrate la congelator, se decongelează. Dacă se consideră necesar, se adaugă antibiotice (streptomycină) și se omogenizează totul cu ajutorul perlelor

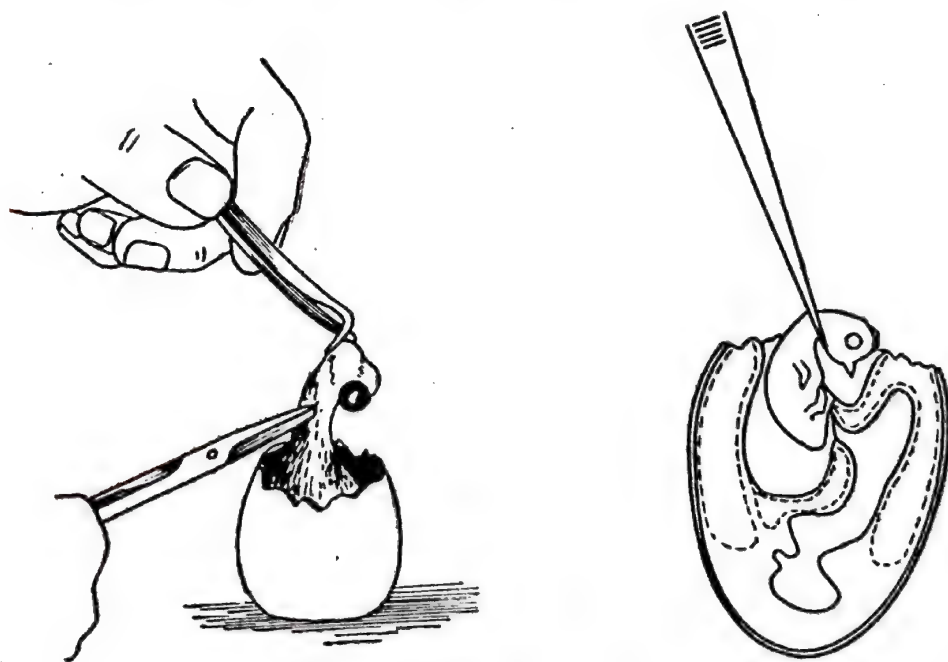


Fig. 102 — Recoltarea embrionului de găină

de sticlă, după care se centrifughează și, din supernatant, se inoculează la alte ouă embrionate, procedindu-se întocmai ca la inocularea primară.

Inocularea animalelor de experiență în vederea izolării, întreținerii sau tipizării unor virusuri

Folosirea animalelor de experiență, în scopul de a izola, întreține sau tipiza un virus, este cu atât mai necesară cu cât unele virusuri nu pot fi cultivate prin alte procedee, sau dacă aceasta reușește, indicațiile nu sînt suficiente pentru a preciza însușirile lor biologice. Alegerea gazdei animale în acest scop este dependentă de spectrul de patogenitate al virusului în cauză, cunoscîndu-se electivitatea pe care diferite virusuri o au pentru diferite specii sau pentru diferite țesuturi. Este necesar însă ca aceste animale să fie libere de virusul respectiv, fapt decelabil, între anumite limite, prin reacții serologice.

Pentru o corectă interpretare a capacității patogene a virusului studiat, este necesar ca animalele inoculate să fie cît mai riguros izolate, mai ales cînd este vorba de virusuri transmisibile prin contact.

O modalitate deosebită, care oferă certitudinea inoculării unor animale indemne, este reprezentată de folosirea așa-numitelor „animale libere de germeni” (germfree sau gnotobiotice). Pentru obținerea acestora se recurge la extragerea prin histerotomie, în condiții perfecte de asepsie, a fetoșilor aflați în ultima fază a dezvoltării lor intrauterine și creșterea lor în continuare la adăpost de germeni.

Vîrsta la care se face inocularea este diferită în funcție de virusul cercetat și de receptivitatea speciei respective. În principiu, cu cît ea este mai fragedă, sensibilitatea animalului este mai mare. Animalele în primele 24 de ore de viață sînt deosebit de receptive față de anumite virusuri. La această vîrstă ele sînt, în unele cazuri, receptive față de virusuri care mai tîrziu nu sînt capabile să determine nici un fel de tulburări sau le pot provoca numai în anumite condiții.

Astfel, de exemplu, șoarecii sînt sensibili față de virusul encefalomielitelor ecvine, al febrei aftoase, față de virusul Cocksackie, față de virusul vaccinal, față de rinovirusuri, față de virusul parainfluenței etc. Șobolanii, iepurii și cîinii sînt sensibili față de virusul febrei aftoase numai la o vîrstă foarte fragedă.

Uneori infecția experimentală reușește numai prin folosirea unei anumite căi de inoculare. Așa de exemplu, infecția cu virusul mixomatozei la șoarecii sugari reușește numai prin inocularea intracerebrală. Inocularea și mai ales pasajele succesive pe o anumită cale, cu care un anumit virus nu este „obișnuit”, se soldează cu o serie de modificări ale însușirilor biologice ale virusului respectiv, mai ales sub raportul patogenității. Astfel, de exemplu, inocularea succesivă a virusului pestei porcine pe cale intracerebrală la iepure, a dus la obținerea unor tulpini lapinizate cu o patogenitate redusă, dar care și-au conservat proprietățile imunogene. De asemenea, inocularea în serie a virusului rabic pe cale intracerebrală la iepure a dus la obținerea „virusului rabic fix” cu însușiri particulare față de virusul „de stradă”.

În același context se poate aminti aci și procedeul de trecere a unor virusuri specifice mamiferelor pe ouă embrionate, obținându-se „tulpini avianizate” cu patogenitate modificată și cu valoare imunogenă conservată.

Alteori, cultivarea unui virus pe o anumită specie de animale de experiență reușește numai după o „adaptare” de durată variabilă (pasaje). Astfel, virusul pseudopestei aviare poate fi cultivat pe șoareci, hamsteri, iepuri, șobolani sau boboci de rață, numai după câteva asemenea pasaje.

Unele virusuri inoculate la animalele de experiență nu se multiplică în organismul acestora, dar se conservă în diferite țesuturi. Astfel este cazul virusului jigodios inoculat la iepure și șobolan. Altele determină infecții latente, care nu se manifestă clinic, deși virusul se multiplică și generează anticorpi specifici, decelabili prin reacții serologice (de exemplu adenovirusurile inoculate la cobai și iepuri).

În fine, trebuie menționat că unele animale de experiență sînt receptive față de infecția cu unele virusuri numai pe cale experimentală, în condiții naturale fiind total refractare. Astfel, poate fi menționat iepurele, care face boala lui Aujeszky numai în condiții experimentale sau cobaiul care face febra aftoasă numai prin inocularea virusului aftos în dermul plantar.

Este necesar ca animalele de experiență să se găsească într-o stare fiziologică optimă (să nu fie subnutrite, carentate, parazitare sau bolnave de alte boli, chiar latente). În caz contrar, rezultatele inoculărilor vor fi eronate sau compromise.

Dintre animalele care pot fi folosite pentru inoculările experimentale în cazul virusurilor cele mai importante sînt:

- iepurele (virusul bolii lui Aujeszky, al mixomatozei, virusul vaccinal, virusul stomatitei veziculare);
- cobaiul (virusul febrei aftoase, virusul vaccinal, virusul stomatitei veziculare);
- hamsterul auriu (virusul stomatitei veziculare, virusul exantemului veziculos al porcului, virusul pneumoniei virotice a hamsterilor);
- șoarecele (virusul parainfluenței, virusul influenței porcine, virusul pneumoniei șoarecilor, virusul turbării, virusul carcinomului mamar murin);
- șobolanul (virusul stomatitei veziculare, virusul influenței porcine);
- ciinele (virusul pestei ecvine, virusul jigodiei, virusul hepatitei infecțioase Rubarth);
- pisica (virusul leucopeniei infecțioase);
- puii de găină (virusul variolei aviare, virusul bronșitei infecțioase, virusul laringotraheitei aviare);
- bobocii de rață (virusul hepatitei bobocilor de rață);
- purceii (virusul pestei porcine clasice, virusul pestei porcine africane, virusul vaccinal, virusul variolei porcine);
- porumbelul (virusul variolei aviare);
- maimuța (reovirusuri, virusuri polio).

Căile de inoculare sînt variabile, în funcție de virusul în cauză și de specia animalului de experiență folosit. Ele sînt identice cu cele folosite în bacteriologie: digestivă, respiratorie, conjunctivală, cutanată, intrader-

mică, subcutanată, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă, intracerebrală, intraoculară etc. Dozele inoculate variază de asemenea cu virusul, tulpina, calea de inoculare, specia, talia și vârsta animalelor folosite.

Teste de sensibilitate a virusurilor

Trebuie precizat însă că în afară de metodele amintite, pentru caracterizarea însușirilor biologice ale virusurilor, se practică frecvent și alte examene, între care testele de sensibilitate față de unii agenți chimici joacă un rol de seamă.

Testul de sensibilitate față de eter. Se pun în contact 1,6 ml virus de cultură, cu 0,4 ml eter în concentrație 20% și se lasă în contact 24 de ore. După acest interval, se evaporă eterul și din materialul obținut se inoculează 4—6 tuburi cu culturi celulare. Apariția efectului citopatic în monostratul celular indică rezistența virusului la eter ceea ce reprezintă un criteriu important de diferențiere în cazul virusurilor citopatogene.

Testul de sensibilitate față de cloroform. Se execută după același procedeu ca și precedentul, numai că după 24 de ore îndepărtarea cloroformului se face prin centrifugare, timp de 30 minute la 3000 t/minut. Cloroformul, fiind mai greu, se depune la fundul cupei de centrifugă. Supernatantul se inoculează în tuburi de culturi celulare și se interpretează rezultatul prin examinare, zilnică, în vederea observării apariției efectului citopatic.

Testul de sensibilitate la pH diferit constă în menținerea suspensiei virale la pH-ul dorit, timp de 3 —4 ore, la temperatura camerei și întuneric. Pentru realizarea pH-ului urmărit (acid sau alcalin) se fac amestecuri în proporții diferite din două soluții:

A — soluție 0,2 molar Na_2HPO_4

B — soluție 0,1 molar $\text{C}_6\text{O}_3\text{H}_7$

Pentru obținerea pH-ului 3, de exemplu, se amestecă 2,02 ml soluție A + 7,98 ml soluție B.

La 10 ml soluție cu pH-ul dorit se adaugă 0,5 ml virus de cultură. După 3—4 ore de menținere la temperatura camerei, se neutralizează cu o soluție de NaOH 0,1 molar în prezența indicatorului roșu fenol și se inoculează 4—6 tuburi de culturi celulare. Dacă în tuburile inoculate, apare efectul citopatic, rezultă că virusul este rezistent la pH-ul respectiv. Toate aceste probe se pot practica în această manieră numai în cazul virusurilor citopatogene.

Reacțiile serologice în identificarea virusurilor și diagnosticul infecțiilor virale

Pentru diagnosticul infecțiilor de natură virală servesc o serie de metode serologice, dintre care le redăm pe cele mai importante.

1 — **Reacția de hemaglutinare** a fost folosită pentru prima dată de Hirst, în 1941, în identificarea virusului gripal (de unde și numele de reacția Hirst). Nu este propriu-zis o reacție serologică, deoarece nu se bazează pe cuplarea antigenului cu anticorpul, ci pe însușirea pe care o au unele virusuri (virusul Newcastle, virusurile influenței A, B, C, virusurile parainfluenței tipurile 1, 2, 3, unele adenovirusuri, arbovirusuri, pox-virusuri), de a determina aglutinarea globulelor roșii, aparținând

diferitelor specii de mamifere și păsări. Mecanismul hemaglutinării variază cu specia de virus în cauză. Hemaglutininele unor virusuri sînt asociate particulei virale, deoarece pot fi separate prin centrifugare sau absorbție (pox-virusuri). În cazul altora (mixovirusuri) virusul conține enzima numită neuraminidaza, care disociază acidul sialic din mucoproteinele receptorilor celulari ai globulelor roșii, ceea ce face ca aceste globule, chiar după eluția virusului, să nu mai fie aglutinabile. Virusul inactivat prin formol sau căldură își menține capacitatea hemaglutinantă. Între virusurile izolate de la animale, virusul Newcastle are cel mai pregnant reprezentată această proprietate. Ea a fost semnalată de Burnet în 1942, care a arătat că virusul pseudopestei aviare determină aglutinarea reversibilă a eritrocitelor de pasăre, adică după ce a fost adsorbit pe suprafața acestora și a determinat aglutinarea, el poate fi separat din nou (fenomen numit eluție), fără a-și pierde capacitatea hemaglutinantă față de alte globule proaspete. Eritrocitele odată aglutinate nu mai sînt aglutinabile, întrucît receptorii celulari, pe care virusul se fixează, au fost distruși printr-un fenomen enzimatic.

Capacitatea virusului de a produce hemaglutinarea nu este anihilată de acțiunea căldurii și a formolului. Eluția virusului însă poate fi alterată prin acțiunea periodatului de potasiu.

Aplicarea fenomenului de hemaglutinare comportă:

- a) prepararea unei suspensii convenabile de globule roșii;
- b) obținerea unei suspensii virale hemaglutinante specifice (cu hemaglutinine).

a) *Prepararea suspensiei de eritrocite de pasăre.* Recoltarea sîngelui se face prin puncția venei axilare sau prin puncția cardiacă. Este preferabilă folosirea sîngelui de amestec de la 2—3 păsări. Recoltarea se face pe citrat 3,8% în proporție de 1/5 și este urmată de centrifugare 10 minute la 1000—1500 t/minut. Plasma se decantează și se înlocuiește cu o soluție fiziologică sterilă de spălare, se centrifughează din nou și după 2—3 spălări, se face o suspensie de 0,5% eritrocite în apă fiziologică sau soluție tamponată (la pH 7,1—7,2). Dacă eritrocitele nu sînt folosite imediat, se pot păstra la +4°C, 4—5 zile, în lichid Alsever (20,5 g glucoză, 8 g citrat de sodiu, 4,2 g NaCl, ad 1 000 ml apă bidistilată, pH-ul fiind de 6,1). Suspensia de eritrocite se prepară întotdeauna ex tempore și trebuie să aibă un aspect mat, moarat.

b) *Suspensia virală* poate fi obținută din lichidele periembrionare ale ouălor de găină, inoculate cu virusul cunoscut, sau cu materialul suspect din culturile celulare inoculate în prealabil cu virusul respectiv. Pentru a obține o cantitate mai mare de corpusculi virali pe unitatea de volum, se poate recurge la concentrarea prin centrifugare timp de 30—60 minute la 12 000—20 000 t/minut sau prin adsorbția virusului pe hematii (40 minute la 0°) și eluarea imediată într-o cantitate de diluant inferioară celei inițiale, de exemplu 10/1 (prin încălzire timp de două ore la baie de 37°C).

Ca material virulent se pot folosi și suspensii de organe (pulmon, ficat, creier etc.), de preferință cele cunoscute ca fiind cele mai bogate în virus (în funcție de boală). Organele se mojarază și se suspendă în soluție fiziologică în proporție de 1/10. După o centrifugare de 15 minute la 3 000 t/minut, supernatantul care conține virusul poate fi folosit pentru reacția de hemaglutinare.

Reacția se poate practica pe lamă, în tuburi sau în plăci cu godeuri.

Reacția de hemaglutinare pe lamă. Pe o lamă de microscop sau, preferabil, pe o placă de porțelan, se pun două picături din materialul virulent. Se adaugă aceeași cantitate din suspensia de globule roșii 1%. Se amestecă cu o baghetă sau prin înclinări repetate. În caz pozitiv, se produce aglutinarea globulelor roșii în câteva minute, sub formă de aglomerări mai mari sau mai mici, inițial spre periferia picăturii, apoi în toată masa amestecului.

Reacția de hemaglutinare în tuburi. În serii de câte 10 tuburi de reacție pentru fiecare probă, se repartizează soluție fiziologică astfel: în primul tub se pun 0,9 ml, iar în celelalte câte 0,5 ml. Se adaugă primului tub 0,1 ml material virulent și se omogenizează, obținându-se în acest fel diluția de 1/10. Din aceasta se trec 0,5 ml în tubul al doilea și se omogenizează, obținându-se diluția 1/20. Se procedează în mod similar până la ultimul tub, realizându-se în continuare diluții crescînde de 1/40, 1/80 ș.a.m.d. (din ultimul tub 0,5 ml se aruncă). În tubul martor se pune doar 0,5 ml soluție fiziologică, fără material virulent. În toate tuburile, inclusiv martorul, se adaugă câte 0,5 ml suspensie de globule roșii 0,5%. Se agită și se lasă în repaus. Citirea se face după 30 de minute și 60 de minute, examinîndu-se fundul eprubetelor cu ajutorul unei oglinzi. Notarea intensității hemaglutinării se face astfel:

- ++++ globulele roșii aglutinate acoperă tot fundul tubului, sub forma unui strat uniform, granular, cu margini neregulate;
- +++ globulele roșii aglutinate acoperă o parte din fundul tubului, depozitul este granular cu marginile franjurate;
- ++ depozitul de globule roșii are aspectul de disc, cu periferia granulară formată din elemente aglutinate;
- + depozitul de globule roșii este de forma unui disc aproape de dimensiunile celui din tubul martor, dar periferia este ușor granulată;
- globulele roșii formează un depozit lenticular, sub forma unui disc roșu de 3—4 mm diametru, cu marginile regulate, în timp ce lichidul supernatant este perfect limpede; prin agitare se omogenizează perfect.

Titrul hemaglutinant al materialului virulent este dat de ultima diluție în care are loc o aglutinare net pozitivă, notabilă cu +.

În acest fel deci, hemaglutinina (suspensia virală hemaglutinantă) este titrată, stabilindu-se și diluția minimă de virus capabilă să provoace o aglutinare totală.

Reacția de hemaglutinare în plăci cu godeuri este din ce în ce mai larg folosită în laboratoarele de specialitate. Plăcile cu godeuri sînt confecționate din material plastic, folosindu-se, de obicei, o singură dată. Pentru obținerea diluțiilor succesive se folosesc dispozitive speciale, manevrate manual sau mecanizat, care realizează și o omogenizare corespunzătoare. Prin asemenea dispozitive se obține un plus de precizie, multă economie de timp, expeditivitate și economie de reactivi.

Trebuie însă precizat că reacția de hemaglutinare nu este strict specifică, în sensul că ea este proprie mai multor virusuri și chiar unor germeni (micoplasmele). De aceea, în completarea ei, este neapărat necesar să se folosească reacția de inhibare a hemaglutinării.

2 — Reacția de inhibare a hemaglutinării. Se bazează pe faptul că anticorpul conținut de un ser imun, provenind de la subiecte trecute prin boală sau imunizate, sînt capabili să neutralizeze capacitatea hemaglutinantă a virusurilor. În general, aceștia ating în organism nivelul decelabil după 7—10 zile de la infecție.

Principiul reacției constă în punerea în contact a serului conținând anticorpul specifici cu suspensia virală și după o incubare de 1/2 oră la 37°C amestecul se pune în contact cu suspensia de globule roșii 0,5%. Reacția se poate folosi în două alternative:

— procedeul alfa — în care suspensia de virus este diluată în serie și amestecată cu cantități egale de ser test cunoscut;

— procedeul beta — în care serul diluat în serie este amestecat cu cantități constante de virus diluat la un număr cunoscut de unități hemaglutinante;

În ambele cazuri, dacă se produce cuplul anticorp-virus hemaglutinant, fenomenul de aglutinare a eritrocitelor nu mai are loc.

Tehnica de lucru. Într-o serie de tuburi de reacție, se fac diluții succesive de ser: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 ș.a.m.d. În acest scop se pun în primul tub 0,45 ml soluție fiziologică iar în celelalte 0,25 ml. Se adaugă apoi în primul tub 0,05 ml ser și se omogenizează prin pipetare, după care se trec în tubul al doilea 0,25 ml. Se omogenizează și se trec în al 3-lea 0,25 ml. Apoi se adaugă fiecărui tub 0,25 ml suspensie de antigen titrat în prealabil prin hemaglutinare, și diluat astfel încît volumul de 0,25 ml să conțină 4 doze minime hemaglutinante. De exemplu, dacă virusul a aglutinat globulele roșii pînă la diluția de 1/160, în reacția de inhibare se va folosi antigenul diluat la un titru de 1/40. Se agită tuburile pentru omogenizare și se lasă la temperatura camerei timp de 15—20 minute. Se adaugă apoi cîte 0,5 ml suspensie de globule roșii 0,5% în fiecare tub. Se agită, se lasă la temperatura camerei 1,1/2—2 ore, după care se face citirea, după aceleași criterii ca la hemaglutinare, numai că imaginile sînt inverse, în sensul că în primele tuburi unde există o cantitate mai mare de anticorpi, hemaglutinarea nu se produce iar globulele roșii se depozitează sub forma unui disc. În tubul martor, ca și în cele cu reacție negativă, din cauza abundenței anticorpilor, virusul se adsoarbe pe eritrocite și are loc hemaglutinarea.

Această reacție permite deci să se stabilească natura anticorpilor dintr-un ser sau specia de virus izolată (prin cultivare) sau existentă în organele de la animale bolnave.

Ca și hemaglutinarea, RIHA se poate efectua și în plăci cu godeuri, tehnica beneficiind de aceleași avantaje. Cantitatea care se folosește în acest caz este de 0,025 ml din fiecare element.

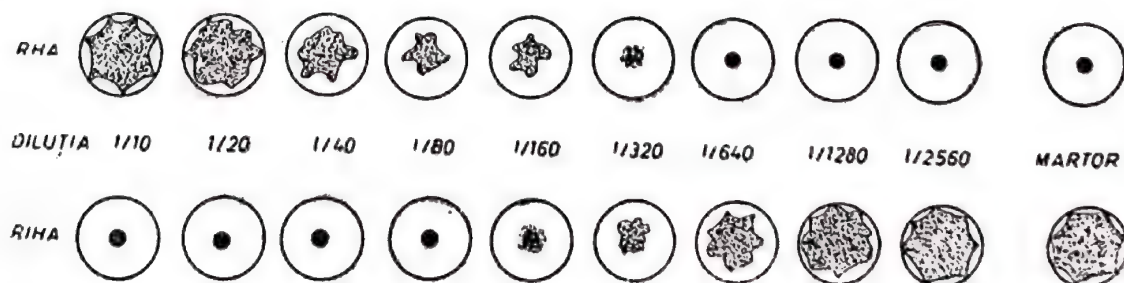


Fig. 103 — Aspectul schematic al fundului eprubetelor în reacțiile de hemaglutinare și inhibare a hemaglutinării

3 — **Reacția de hemaglutinare indirectă sau pasivă** este o variantă a reacției de hemaglutinare și constă în aglutinarea de către serul imun a antigenului viral adsorbit în prealabil pe hematii tanate și formolate.

4 — **Reacția de hemadsorbție** este utilă în special în cazul acelor virusuri care nu au însușiri citopatogene pregnante sau le lipsesc total, dar dispun de capacitate hemadsorbantă. Pentru a pune în evidență această însușire, se folosește direct cultura celulară în care s-a dezvoltat virusul. În acest caz, adăugarea unei suspensii de globule roșii spălate, se soldează cu fixarea acestora pe celulele în care există virusul, în timp ce, virusul lipsește, globulele roșii plutesc libere deasupra stratului celular și se pot îndepărta prin spălare ușoară. Fenomenul de hemadsorbție se observă mai bine prin examenul microscopic al monostratului celular.

5 — **Reacția de inhibare a hemadsorbției.** Dacă înainte de adăugarea suspensiei de globule roșii, cultura celulară conținând virusul hemadsorbant se tratează cu un ser imun corespunzător, hemadsorbția nu mai are loc.

6 — **Testul hemolizei** se bazează pe capacitatea unor virusuri de a determina liza globulelor roșii. A fost descris de BURNET în 1950, dar nu este prea folosit.

7 — **Testul anticorpilor fluorescenți** permite depistarea foarte precoce a virusurilor. Se bazează pe faptul că anticorpilor specifici pot fi cuplați cu substanțe fluorescente (cel mai frecvent folosit este izotiocianatul de fluoresceină) și prin unirea cu particulele virale corespunzătoare, acestea devin vizibile la examinarea în lumină ultravioletă. Se poate folosi o metodă directă și una indirectă.

În cazul metodei directe, substratul celular cultivat pe lamele, în tuburi Barski și conținând antigenul (particule virale) este tratat cu serul specific cuplat cu substanța fluorescentă. După o perioadă de contact variabilă, se procedează la spălarea substratului celular. Dacă el conține virusul căutat, cuplul antigen-anticorp-substanță fluorescentă nu este îndepărtat prin spălare și la examinare în RUV apar particule fluorescente.

În cazul metodei indirecte, cu ajutorul unui substrat celular infectat cu un virus cunoscut, se caută prin punerea în contact cu seruri de la indivizi suspecti, prezența anticorpilor specifici. În folosirea unor diluții variabile se poate determina titrul exact al anticorpilor.

8 — **Testul de seroneutralizare.** Încă din 1889 VICTOR BABEȘ a arătat că sîngele animalelor imunizate antirabic are *in vitro* capacitatea de a face neinfecțantă o suspensie de virus rabic. Anticorpilor formați în mod activ de către un organism care a venit în contact cu un agent viral, sînt capabili să neutralizeze valoarea infectantă a virusului corespunzător. Pe această bază a fost concepută reacția de seroneutralizare. Ea presupune două etape principale:

a) contactul dintre virus și serul specific (proces ce se desfășoară *in vitro*).

b) inocularea amestecului virus-ser la o „gazdă” sensibilă, capabilă să indice dacă virusul a rămas sau nu activ în amestec.

Ca „gazde” se pot folosi animale de laborator, ouă embrionate sau culturi celulare. Folosirea culturilor celulare pentru reacții de seroneu-

tralizare prezintă o serie de avantaje față de ouăle embrionate sau animalele de experiență și anume:

- culturile celulare sînt lipsite de sisteme de apărare ale organismului și prin aceasta sînt mai sensibile;

- culturile celulare reprezintă o unitate biologică mult mai omogenă decît animalele sau ouăle embrionate, atît ca tip de celule cît și ca susceptibilitate; animalele de laborator și în bună măsură și ouăle dovedesc mari variații individuale, cu posibilități fiziologice diferite;

- rezultatele se pot citi mult mai repede în cazul culturilor celulare;

- culturile oferă posibilități de efectuare a reacției, folosind virusuri față de care nu există animale de laborator sensibile (unele adenovirusuri, virusurile ECHO);

- culturile celulare sînt mai puțin costisitoare și mai ușor de manevrat.

Seroneutralizarea se poate folosi în mai multe scopuri:

- a. identificarea unui virus izolat, necunoscut, folosind seruri imune cunoscute;

- b. identificarea unor seruri necunoscute, utilizînd virusuri cunoscute ca de exemplu în determinarea prezenței în sîngele unor animale a anticorpilor față de un anumit virus.

Elementele reacției de seroneutralizare:

- *culturile* care trebuie să fie omogene, preparate din țesuturi sau celule cunoscute ca fiind sensibile față de virusul cu care se va lucra, iar mediul nutritiv trebuie să asigure o viabilitate corespunzătoare;

- *virusul* care reprezintă o suspensie obținută din cultura virusului respectiv în culturi de celule, cu un titru cunoscut, determinat în prealabil, care va condiționa și diluția în care se va folosi;

- *serul* care este obținut prin hiperimunizarea diferitelor animale de laborator cu virusuri cunoscute, conform unei scheme de imunizare corespunzătoare. Conservarea serurilor se face sub formă congelată la -20°C sau liofilizată. Se vor folosi diluții crescînde de ser în SST, soluție Hanks sau Earle (nu în apă fiziologică obișnuită).

Tehnica reacției constă în punerea mai întîi în contact *in vitro* a diluțiilor de ser imun cu suspensia virală avînd un titru de 100 DLP₅₀ (în volume egale). După o incubajie de 1—2 ore la 37°C la termostat, amestecul se inoculează pe culturi celulare și se urmărește apariția efectului citopatic, prin examinare periodică la microscop. Din fiecare diluție se inoculează 4—5 tuburi cu cultură, avîndu-se în același timp grija de a avea și tuburi de control după cum urmează:

- 4—5 tuburi inoculate numai cu virus;

- 4—5 tuburi inoculate numai cu ser;

- 4—5 tuburi neinoculate.

Examinarea culturilor începe cu tuburile în care s-a inoculat numai virus, apoi cele inoculate cu amestec ser-virus și, în fine, cele neinoculate. Acestea din urmă trebuie să rămîină de aspect normal, ca și cele în care s-a inoculat amestec virus-ser în proporții corespunzătoare.

Reacția de seroneutralizare se poate efectua fie cu scopul de a pune în evidență existența în serurile indivizilor bolnavi sau suspecti a anticorpilor specifici, caz în care se lucrează cu suspensii de virus cunoscute,

fie cu scopul de a identifica un virus, caz în care se lucrează cu seruri imune cunoscute.

Există și teste cantitative care urmăresc stabilirea puterii de neutralizare a unui ser, exprimată în unități neutralizante pe ml. În acest scop, se pot folosi metode diferite (metoda virus-ser variabil, sau metoda ser constant-virus variabil).

Reacția de seroneutralizare se poate aprecia și prin metoda reducerii plajelor care oferă posibilitatea unor neutralizări foarte precise. În acest scop, se pot folosi culturi în monostrat celular acoperit cu un strat de agar sau celule libere înglobate în agar, după tehnicile descrise de DULBECCO și VOGT. Metoda constă în amestecarea unor diluții diferite de ser cu cantități constante dintr-o suspensie virulentă diluată, astfel încât să producă un anumit număr de plaje. Pentru interpretare se compară numărul plajelor formate în plăci cu ser și în plăci fără ser.

În cazul folosirii ouălor embrionate, după contactul virusului cu serul imun se procedează la inocularea pe cale intraalantoidiană sau intravite-lină, urmărindu-se apoi, prin ovoscopie, moartea embrionilor sau, prin sacrificare la anumite intervale, instalarea unor leziuni specifice. Când virusul este neutralizat, acestea nu apar.

În cazul aplicării seroneutralizării pe animale, se aleg specia, calea și doza de inoculare, cea mai corespunzătoare, urmărindu-se apoi apariția semnelor clinice și a leziunilor specifice.

Testul inhibiției metabolice este o reacție de seroneutralizare care se folosește pentru identificarea unor enterovirusuri, adenovirusuri și herpes-virusuri producătoare de efect citopatic precoce. În acest scop, se vor face diluții seriate din seruri test cunoscute, la care se va adăuga o suspensie virală în diluție cunoscută și constantă. Amestecul se inoculează apoi în tuburi cu culturi celulare proaspete și se urmărește virarea culorii mediului; un pH de 7,4 și mai mare la sfârșitul perioadei de incubație indică o activitate citopatogenică prezentă, deci dezvoltarea virusului, în timp ce un pH de 7,2 și mai mic pune în evidență fenomenul de neutralizare a acestuia.

Testul de neutralizare poate fi folosit și pentru identificarea unor toxine pe care unele virusuri și rickettsii le pun în libertate în mediul în care se dezvoltă.

9 — Testul fixării complementului este unul din cele mai larg folosite, mai ales datorită rapidității obținerii rezultatelor. În majoritatea virozelor, anticorpii fixatori apar mai târziu decât cei neutralizanți sau aglutinanți — în general după 10—12 zile — și titrul lor scade mai rapid.

Tehnica, în principiu, este aceeași cu cea descrisă anterior. S-au aplicat însă diferite modificări menite să-i mărească gradul de specificitate. Astfel se poate aminti de exemplu fixarea complementului la $+4^{\circ}\text{C}$ în loc de $+37^{\circ}\text{C}$. Datorită faptului că virusurile nu se pot cultiva decât pe celula vie, antigenii nu pot fi preparați decât din celule vii sau lichide infectante, ceea ce impune introducerea în reacție a unui martor conținând țesut normal neinoculat (similar cu cel pe care s-a cultivat virusul). În laboratoarele moderne se folosesc microteste practicate cu dispozitive de diluție automată sau semiautomată care simplifică și ușurează foarte mult întregul proces. În plus, se realizează economie de ingrediente ceea ce este important mai ales în ceea ce privește antigenul viral, care nu se poate obține în cantități mari, cu atita ușurință ca în bacteriologie.

În cazul acestor microtehnici, se folosesc volume mai mici de 0,02 ml lucrându-se cu micropipete sau prin picături (o picătură este de 0,02 ml) iar volumul total de reacție fiind 0,1 ml. Se pot folosi în același scop și anse speciale, calibrate la un volum fix, riguros determinat.

10 — Testul de precipitare se folosește după tehnica difuziunii în gel descrisă de OUCHTERLONY și constă în folosirea unor antigene virale (suspensii de virus în lichidele nutritive ale culturilor celulare, în lichidele embrionare, suspensii de organe de la animale inoculate experimental), de obicei concentrate și a unor seruri imune corespunzătoare. Acestea se amplasează în godeuri efectuate în agar special, la distanțe bine determinate. Antigenii virali difuzează de la nivelul godeurilor unde au fost amplasați concomitent cu anticorpii conținuți de serul imun. La locul de întâlnire a celor două componente rezultă linii de precipitare vizibile cu ochiul liber mai ales după o colorare corespunzătoare. Metoda a fost folosită cu succes în studii asupra virusurilor variolice, a adenovirusurilor și a unor herpes-virusuri. La enterovirusuri metoda nu a dat rezultate. Este necesară însă folosirea unor antigene foarte concentrate, pentru ca interpretarea să poată fi fidelă.

Tehnica detaliată a reacției de imunodifuziune în gelul de agar, pentru diagnosticul anemiei infecțioase a calului, de exemplu, este descrisă la capitolul „Examenale serologice“.

Se înțelege că dintre cele două elemente (antigenul sau anticorpul) unul trebuie să fie cunoscut. Deci reacția se poate folosi fie pentru a identifica un virus necunoscut cu ajutorul unui ser imun cunoscut, fie pentru decelarea într-un ser suspect a prezenței anticorpilor specifici, folosind un virus cunoscut.

O variantă a acestei metode este testul de precipitare radioizotopic în care se folosește virus radioactiv și se măsoară gradul de radioactivitate al precipitatului rezultat din contactul cu anticorpii specifici.

11 — Testul de floclare se folosește pentru virusurile variolice, influenței, virusul febrei aftoase; nu a luat o extindere largă. Anticorpii floclanți apar mai devreme și dispar mai precoce după infecție.

Tehnici pentru cercetarea virusurilor bacteriofagice

Bacteriofagii sînt virusuri „patogene” pentru bacterii, care pot determina în mod specific liza germenilor bacterieni printr-o tulburare survenită în fiziologia celulei datorită multiplicării lor în interiorul bacteriilor (și acumulării unor complexe chimice toxice). Descoperirea lor, legată de numele lui D'HERELLE (1917), pe lângă că a lămurit o serie de fenomene curioase observate în cursul lucrărilor de laborator, a deschis perspective practice importante în procesul de tipizare a bacteriilor și chiar în terapia unor infecții bacteriene.

Fagul, ca parazit la nivel genetic, realizează în celula bacteriană sensibilă adaptarea tuturor funcțiilor acesteia, la sinteza componentelor structurale necesare asamblării fagice. „Infecția” se termină prin ruperea membranei celulare (liza celulei) cu diseminarea particulelor fagice neoformate și începerea unui nou ciclu sau, în alte cazuri, prin simpla integrare a genomului fagic (profag) în genomul celulei gazdă. În această din urmă situație, fiecare multiplicare a genomului celular antrenează simultan o multiplicare a genomului fagic. Cu fiecare ciclu de multiplicare crește și numărul profagilor, iar la intervenția unor factori favorizanți (de temperatură, iradiere cu U.V. etc.), ei acționează ca inițiatori ai unui proces litic.

Sinteza diferitelor componente ale fagilor este secvențială și reglată în mod foarte riguros, finisarea realizîndu-se prin autoasamblare. În principiu, se recunosc trei secvențe ale procesului de morfogeneză fagică: sinteza acidului nucleic fagic, a capului și a cozii. Procesul este reglat de cca 20 de gene, unele codificînd sinteza proteinelor de structură, altele intervenind în reglarea acestor sinteze. O parte din ele dirijează sinteza acidului nucleic (de exemplu ADN) în timp ce altele se „ocupă” de sinteza proteinelor constitutive ale capului și cozii și maturarea lor.

Fagii, ca și alte virusuri, fiind paraziți obligatorii ai unor microorganisme vii, nu se găsesc liberi în natură și însoțesc îndeaproape gazdele receptive. Produsele bogate în microorganisme sînt, ca urmare, sursele de bacteriofagi cele mai abundente.

În principiu, cercetarea fenomenelor de bacteriofagie trebuie să aibă în vedere următoarele:

— pentru multiplicarea fagilor trebuie să se folosească culturi bacteriene tinere, în faza de multiplicare logaritmică (culturi de 1—2 ore în mediu lichid obținute prin transplantare dintr-o cultură de 24 de ore pe mediu solid);

— mediile de cultură trebuie să fie convenabile sub raportul pH-ului și conținutului nutritiv, față de cerințele specifice ale bacteriei indicator și fagilor respectivi;

— să respecte particularitățile biologice și de rezistență ale fagilor cercetați față de agenții fizici și chimici.

Izolarea unui fag se poate face plecând fie de la un mediu natural, fie de la o bacterie lizogenă (capabilă de a suporta infecția latentă cu fagul pe care îl transmite ereditar la descendenți fără a fi lizate). În acest scop sînt necesare:

— tulpini bacteriene-test;

— medii de cultură convenabile pentru cultivarea tulpinilor test.

Ca tulpină-test poate servi orice sușe bacteriană, cu condiția să nu fie lizogenă și să fie sensibilă la fagi.

În mediul natural, produsele care oferă cele mai sigure surse de fagi sînt materiile fecale, solul și apele de canal.

Din materiile fecale (metoda D'HERELLE, 1938): la 1 g fecale se adaugă 20 ml bulion. Amestecul se ține la 37°C timp de o oră și apoi, eventual după o centrifugare de 20—30 minute la o turație de 2000—3000 t/minut sau o trecere prin hîrtie de filtru, se filtrează prin Seitz sau un alt filtru care reține bacteriile (G_5). Dat fiind faptul că, atît hîrtia de filtru cît și filtrul Seitz sau filtrele de porțelan rețin o bună parte din fagi reducînd substanțial titrul lor, în ultimul timp se folosesc cu precădere filtrele din sticlă sinterizată sau membranele Gradocol. Se poate recurge și la tratarea cu cloroform (0,5 ml cloroform la 10—20 ml) urmată de agitarea energică, după care se lasă să se limpezească cîteva ore la temperatura camerei sau peste noapte la frigider, după care se decantează. În cazul sistemelor fagobacteriene în care fagii sînt mai rezistenți la temperatură decît bacteriile gazdă se poate face și tratarea termică timp de 30—60 minute la 57—58°C. Filtratul, bacteriologic steril, este testat din punct de vedere al activității sale fagice, față de tulpini bacteriene cunoscute ca lizosensibile față de fagul căutat.

Din sol, tehnica de izolare este asemănătoare: 1 g de sol se suspendă în 20 ml bulion, se incubează la 37°C o oră, după care se centrifughează și filtrează întocmai ca și în cazul precedent.

Din apa de canal: într-un flacon de 1000 ml se pun 100 ml mediu nutritiv și 200 ml apă de cercetat. Amestecul se însămînțează cu o bacterie sensibilă, nelizogenă, pentru care se caută bacteriofagul respectiv. După o incubatie de 18—24 ore la 37°C se separă bacteriofagul prin filtrare.

Din culturile lizogene: cultura bacteriană în mediu lichid, obținută prin incubatie la temperatura și pe o durată preferată de specia respectivă, este debarasată de corpii bacterieni prin centrifugare (20 minute la 2000—3000 t/minut) sau prin filtrare. Se poate recurge și la o încălzire de 30 de minute la 57—58°. În cazul culturilor sporogene bacteriile se elimină prin filtrare sau se distrug cu ajutorul substanțelor bactericide (mertiolatul 1/5 000—1/10 000).

Punerea în evidență a prezenței fagilor se poate face prin metode diferite.

Conform unei prime metode, germenii sensibili și nelizogeni (dacă este posibil tulpini standard) se însămînțează abundant pe suprafața agarului din plăci Petri. Excesul de lichid se absoarbe cu pipeta și se

înlătură, iar placa este lăsată descoperită, pentru zvîntare timp de 15—20 minute la termostat sau în apropierea flăcării. Apoi se depun pe suprafața însămînțată, picături din materialul presupus a conține fagi, în puncte distanțate (6—8 puncte pe o placă), însemnîndu-se pe fundul plăcii, locul însămînțat și indicativul tulpinii însămînțate. Placa se pune la incubat (de obicei la 37°C la termostat) și după 20—24 de ore se face citirea. În locurile unde s-a însămînțat inoculul conținînd fagi activi, se produce liza culturii, zona apărînd lipsită de colonii bacteriene (plajă).

O altă metodă preconizează însămînțarea în dublu strat de agar. În acest caz, se toarnă un strat de agar 2% topit și răcit la 45°C, în plăci Petri. Se lasă să se solidifice. Paralel, se pregătesc tuburi cu cîte 1—2 ml agar moale (0,7%) topit și răcit la 45°C. Acestea se însămînțează cu cîteva picături din cultura de 24 de ore din tulpina bacteriană sensibilă, menținîndu-se în continuare la 45°C.

În tuburile astfel însămînțate se adaugă filtratul presupus a conține bacteriofagul cercetat, după care conținutul fiecărui tub se toarnă în plăcile conținînd stratul de agar 2% solidificat. Se incubează 24 de ore la 37°C.

În cazul că în filtratul adăugat există fagi activi, în plăci vor apărea zone de liză, numite plaje, avînd dimensiuni variabile în funcție de capacitatea litică de care dispun.

Pentru a izola bacteriofagul în cultură pură, din aceste plaje se face transplantarea, cu ajutorul unei anse sterile cu care se atinge centrul unei plaje, după care se introduce într-o cultură tînă în bulion, a aceleiași tulpini bacteriene care s-a folosit inițial. Se incubează 24 de ore la 37°C și dacă cultura se clarifică se deduce că bacteriofagul a fost izolat.

Pentru a păstra tulpinile de bacteriofagi izolate se recomandă spălarea cu bulion a culturii pe agar a tulpinii bacteriene sensibile, menținerea timp de 90—120 minute la 37°C. Se adaugă fagul, se ține la termostat 24 de ore și apoi bacteriile se distrug prin încălzire (o oră la 59—60°C) sau se elimină prin filtrare.

Titrare bacteriofagilor necesită: culturi lizosensibile, fagi activi și medii de cultură convenabile.

— Culturile lizosensibile trebuie să fie în prealabil bine controlate. Pentru cercetări de precizie este preferabil să se folosească tulpini standardizate. Acestea se cultivă pe agar și din culturile de 24 de ore se fac suspensii în bulion, care se țin 90—120 minute la 37°C și apoi se însămînțează pe plăci Petri cu agar. Aceasta se face în mai multe zone circulare (8—12) avînd diametrul de 1 cm și fiind marcate pe fundul plăcii. După însămînțare, placa întredeschisă este ținută la 37°C timp de 15—20 minute, timp în care apa din picătura însămînțată se evaporă, iar germeii însămînțați intră în faza logaritmică de multiplicare. Apoi, în fiecare zonă însămînțată cu bacterii se amplasează cu o ansă standard (5 mm diametru) diluțiile de bacteriofag.

— Fagul activ este în general reprezentat prin mediul lichid obținut prin filtrarea unei culturi bacteriene în care s-au produs procese de liză bacteriofagică. În vederea titrării sale, fagul este diluat din 10 în 10 în bulion. Fiecare diluție este însămînțată pe o zonă de cultură după tehnica enunțată.

— Mediul de cultură variază în raport cu specia bacteriană cu care se lucrează. În general se folosesc medii care oferă cele mai bune condiții de dezvoltare.

Pentru titrarea propriu-zisă se pot folosi diferite tehnici:

O primă tehnică constă în însămînțarea unei anumite cantități din diluțiile seriate de bacteriofagi în dublu strat de agar. În acest scop,

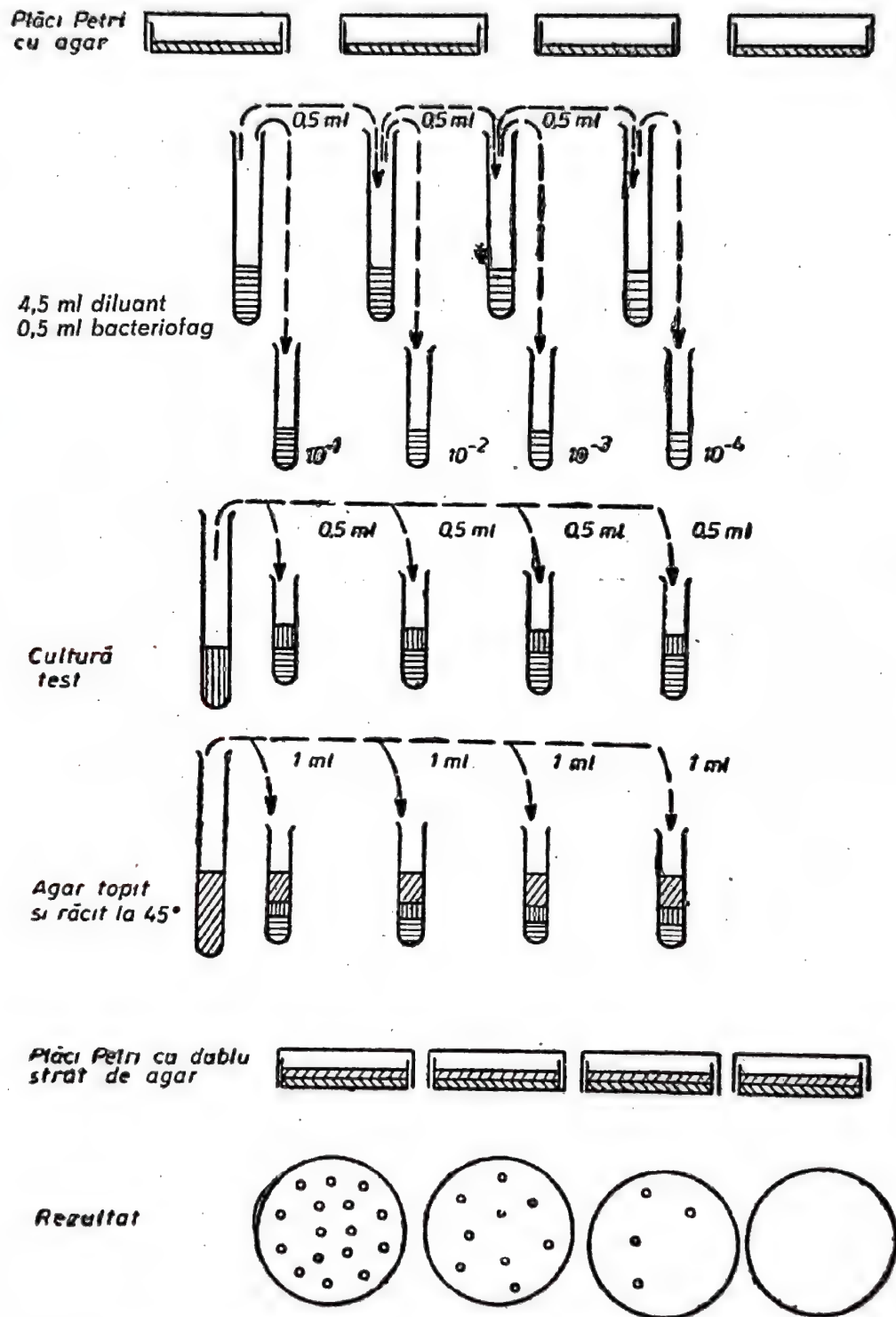


Fig. 104 — Schema titrării bacteriofagilor prin metoda dublului strat de agar

se toarnă mai întâi agar 2% în atâtea plăci câte diluții de bacteriofag urmează să se folosească (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} etc.). În tuburi de reacție se fac aceste diluții, punându-se inițial 4,5 ml bulion în fiecare tub. Apoi se pun 0,5 ml filtrat care conține bacteriofag, în primul tub, se omogenizează și se trec 0,5 ml în tubul al doilea. După omogenizare se trec 0,5 ml în al treilea, ș.a.m.d.

Peste diluția de bacteriofag se adaugă câte 0,5 ml din cultura bacterienă-test, iar apoi câte 1 ml de agar topit și răcit la 45°C. Se omogenizează și se toarnă peste stratul de agar 2% solidificat. Plăcile astfel însămînțate se pun la termostat și după 24 de ore se face citirea, apreciindu-se numărul de plaje din plăcile însămînțate cu diluții diferite de bacteriofag. Titrul se exprimă prin numărul de PFU (plaque forming units = unități formatoare de plaje) pe ml și se obține înmulțind numărul plajelor cu diluția.

După o altă tehnică se depune câte o picătură din fiecare diluție de bacteriofag pe suprafața unei plăci însămînțate în gazon, cu specia bacteriană sensibilă (fundul plăcii se împarte prin linii în suprafețe pătrate în centrul cărora se dispune picătura de bacteriofag diluat). Plăcile se incubează la termostat și după 6—24 de ore se face citirea, apreciindu-se diluția maximă activă (în care există cel puțin o zonă de liză).

Tipizarea fagică constă în identificarea unor specii sau a unor tulpini bacteriene cu ajutorul fagilor specifici. Se bazează pe faptul că fagii dispun de o specificitate strictă, în sensul că fiecare din ei este adaptat la parazitismul unei anumite specii bacteriene. Metoda este una dintre cele mai utile în procesul de tipizare a multor germeni bacterieni, ea prezentînd, în același timp, și o deosebită importanță din punct de vedere epidemiologic, întrucît permite identificarea surselor de infecție. Se înțelege că efectuarea acestor tipizări se poate realiza numai în laboratoarele care dispun de colecții (seturi) de fagi suficiente.

În vederea testării, se procedează întâi conform unei tehnici expeditivă, la desenarea pe fundul plăcii Petri a unui număr de pătrate egal cu numărul de fagi care urmează a fi folosiți. În placă se toarnă apoi mediul de cultură și după solidificarea acestuia, se însămînțează tulpina de cercetat. Se lasă apoi placa, cu capacul întredeschis, la termostat, pentru zvîntare și în fine, se pune câte o picătură din fiecare lizat fagic cu care se lucrează, în câte un pătrat, avîndu-se grija de a se nota exact.

După incubare la termostat se notează fagii care au produs plaje în gazonul de cultură bacteriană. Tipul fagic se stabilește deci după tulpina de fag față de care tulpina bacteriană respectivă se dovedește a fi sensibilă.

Prin *lizotipie* este posibilă diferențierea unor tulpini bacteriene aparținînd aceleiași specii bacteriene care din punct de vedere biochimic și serologic sînt întru totul identice (de exemplu în cazul salmonelelor, stafilococilor etc.).

Metode de examinare a rickettsiilor și chlamidiilor

Rickettsiile și chlamidiile (bedsonii, pararickettsii, miagawanelle, neo-rickettsii) sînt microorganisme situate la limita dintre bacterii și viruși și avînd o serie de însușiri comune atît cu unele cît și cu celelalte. Ele sînt observabile la microscopul de lumină, apărînd ca formațiuni pleiomorfe, dar mai ales de aspect cocobaciliar.

Sînt imobile, necapsulate, nesporulate.

Se colorează cu compuși anilnici, în special cu fucsina, prezentînd un grad redus de acidorezistență.

Traversează unele filtre bacteriologice (Seitz cu plăci EK), dar cu scăderea considerabilă a titrului în corpi rickettsieni.

Colorarea rickettsiilor și chlamidiilor se poate face folosindu-se una din metodele speciale expuse anterior: Giemsa-Romanovski, Macchiavello, Stamp, Castaneda etc.

Punerea în evidență a corpurilor rickettsieni reușește fie din produse patologice brute (raclate conjunctivale în cazul rickettsiozei oculare a rumegătoarelor, placentă, scurgeri uterine, avortoni în cazul avorturilor de această natură etc.), din sacul vitelin al ouălor inoculate cu material patologic etc. Indiferent de proveniență, colorarea prin una din metodele amintite, pune în evidență formațiuni colorate în roșu rubiniu, intra- sau extracelulare, contrastînd cu restul formațiunilor din frotiu. Pentru reușita examenului microscopic este important să se respecte cîteva condiții:

- frotiurile să fie cît mai subțiri;
- coloranții să fie de bună calitate și bine filtrați, pentru a nu conține impurități și mai ales precipitate;
- să se facă o spălare temeinică a frotiurilor pentru a îndepărta eventualele precipitate;
- microscopul să aibă o capacitate de rezoluție ridicată.

Cultivarea rickettsiilor și chlamidiilor se face, așa după cum s-a mai amintit, numai pe celule vii. În mod curent, se folosește cultivarea pe ouă embrionate și inocularea la animale de experiență.

În cazul ovoculturilor calea cea mai propice este cea intravitelină. Vîrsta la care se inoculează este a 5—7-a (maximum a 9-a) zi de incubație. Ouăle cu embrionii morți pînă la 4 zile după inoculare se elimină. De la ceilalți, care mor între a 4-a și a 10-a zi, se recoltează sacul vitelin și se face controlul prezenței rickettsiilor, prin examen microscopic. Frotiurile se practică din pereții sacului vitelin.

Infecția experimentală. În cazul *rickettsiilor* se folosește cel mai frecvent cobaiul, care este mai sensibil. Inoculat cu material virulent reacționează prin tulburări generale, cu hipertermie și în unele cazuri, prin peritonită (reacția Weil—Mooser) care este caracteristică pentru unele specii de *rickettsii*.

Pentru inoculare materialul patologic se mojarază, se suspendă în soluție fiziologică, în proporție de 1/10, se centrifughează 5 minute la 1500 turații/minut. Pentru aseptizare se folosește de preferință streptomicina, cunoscând că penicilina în doză de peste 400 UI atrage moartea cobailor, ceea ce desigur, constituie sursă de erori. Supernatantul se inoculează pe cale subcutanată, în cantitate de 2—5 ml la cobai în greutate de cca 200 g.

Inocularea este urmată de termometria zilnică și recoltarea de sînge prin puncție cardiacă în perioada curbei termice maxime (peste 39,5°C, în general la 4—7 zile de la inoculare). Animalele se sacrifică în momentul scăderii temperaturii. Pentru transmitere în serie se folosesc suspensii de splină și glande suprarenale. Într-o etapă următoare, se procedează la inocularea de embrioni de găină pe cale intravitelină, cu sînge și respectiv splină și glande suprarenale de la cobai infectați.

În cazul *chlamidiilor* infecția experimentală reușește cel mai bine pe șoarece. Inoculați pe cale intranasală cu 3—4 picături de material patologic aceștia mor în 2—10 zile. Dacă moartea nu se produce, ei se sacrifică și din pulmonul lor se fac suspensii care se reinoculează la alte animale pe aceeași cale (pasaj orb). Dacă după 3 pasaje oarbe, animalele nu reproduc boala și deci nu mor, se consideră că materialul patologic nu a conținut agenți *chlamidieni*.

Aseptizarea materialului se face numai cu streptomycină sau amestec de streptomycină-sulfamide. Penicilina este contraindicată deoarece *chlamidiile* sînt sensibile față de acest antibiotic.

În cazul cînd pentru izolarea *chlamidiilor* se folosesc fecalele unor specii de animale suspecte, se procedează mai întîi la triturarea temeinică a lor, într-un mojar steril și suspendarea în proporție de 10% în bulion. Se supune apoi suspensia unei centrifugări de 20 de minute la 3000 turații/minut. Supernatantul se decantează, se recentrifughează timp de 30 de minute la 4000 T/minut, se decantează din nou și la supernatant se adaugă 1000 gamma streptomycină pe ml. Se pune apoi 2 ore la termostat, apoi o oră la frigider și se inoculează pe cale intraperitoneală la cobai.

Examenle serologice se folosesc atît pentru identificarea *rickettsiilor* izolate cît și pentru decelarea anticorpilor specifici în singele animalelor bolnave sau trecute prin boală.

1 — *Hemoaglutinarea rapidă* — folosită mai ales în diagnosticul tifosului exantematic la om — se bazează pe proprietatea pe care o are singele indivizilor bolnavi sau trecuți prin boală de a aglutina suspensiile de *Proteus tulpina* X₁₉. De fapt aceasta este o paraaglutinare. Tehnica reacției constă în următoarele: pe o lamă se pun 3 picături de sînge suspect și se lasă să se usuce la temperatura camerei. La prima picătură se adaugă 0,02 ml suspensie alcoolată de *Proteus* X₁₉, la a doua 0,04 ml și la a treia 0,08 ml. Citirea se face după 1—30 minute și constă în aprecierea aglutinării particulelor bacteriene, care apar sub formă de grunji,

intii la periferia picăturilor. În funcție de concentrația în anticorpi a singelui aglutinarea poate apărea în una sau mai multe din picături.

Reacția se poate executa și cu suspensii formolate de corpi rickettsieni obținuți prin cultivarea pe ouă embrionate. Se pun în contact pe o lamă o picătură de ser — în diluția dorită — și o picătură de antigen. Amestecul se lasă la temperatura camerei în atmosferă umedă (într-o placă Petri avînd pe capac o hîrtie de filtru îmbibată în apă distilată) timp de 10 ore. Se usucă apoi la 37°C și se colorează prin metoda May Grünwald Giemsa. Preparatele se examinează apoi la microscop. Cînd reacția este negativă particulele rickettsiene apar dispersate uniform în cîmpul microscopic, iar în caz de reacție pozitivă, ele apar grupate în grămezi, mai mult sau mai puțin mari (10—15 particule).

2 — *Aglutinarea lentă în tuburi* numită și reacția Weil—Felix, se folosește în diagnosticul tifosului exantematic și al tifosului murin.

Ca antigen, s-au folosit inițial suspensii de *Proteus* X₁₉, iar în ultimul timp culturi rickettsiene obținute prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*. Anticorpii ating nivele semnificative după 7—9 zile de la infecție. În medicina veterinară s-au folosit antigene rickettsiene obținute prin cultivarea pe ouă embrionate sau din pulmonii de la animale inoculate pe cale respiratorie.

3 — *Reacția de fixare a complementului* este una din cele mai precise și, ca urmare, mai frecvent folosite în diagnosticul infecțiilor rickettsiene și chlamidiene. Principiul reacției ca și tehnica sînt aceleași ca și în cazul infecțiilor bacteriene, diferind doar antigenul. Anticorpii fixatori apar în jurul zilei a 7-a de la infecție, titrul lor crescînd progresiv, pentru ca între zilele a 20-a și 25-a să atingă un titru maxim. Ei pot persista perioade îndelungate, luni și chiar ani de zile, însă la nivele mai scăzute.

4 — *Reacția de seroneutralizare* se bazează pe capacitatea pe care o au anticorpii corespunzători din serul animalelor imunizate, de a neutraliza valențele patogene ale rickettsiilor și respectiv chlamidiilor. Testarea se face prin inoculare, fie în ouă embrionate fie la animale de experiență receptivă. Materialul de inoculat se pune în acest caz în contact cu antiserul corespunzător, timp de 30 minute înainte de inoculare.

5 — *Reacția de precipitare* presupune folosirea de seruri hiperimune, care, puse în contact cu produse patologice de la indivizi bolnavi sau trecuți prin boală (urină, suspensii rickettsiene obținute prin izolarea cu ajutorul uneia din metodele de cultivare), produc un inel de precipitare albicios, la nivelul zonei de contact al celor două lichide (reacția se desfășoară în tuburi de reacție).

6 — *Imunofluorescența* se bazează pe folosirea anticorpilor marcați cu o substanță fluorescentă și este una din metodele care cîștigă teren în ultimul timp, datorită fidelității ei. Principalele avantaje ale metodei constă în precocitatea diagnosticului, operativitatea și specificitatea reacției. Inițiatorul metodei este COONS și col. (1942). Principiile și tehnica sînt asemănătoare cu cele folosite în cazul altor microorganisme.

*
* *
*

În continuare sînt date cîteva elemente de tehnică referitoare la modul de preparare a unor antigeni rickettsieni, aceştia stînd la baza reacţiilor serologice folosite în diagnosticul infecţiilor provocate de aceşti agenţi patogeni.

Prepararea antigenului rickettsian se face din saci vitelini provenind de la embrionii inoculaţi pe cale intravitelină. Pentru recoltarea sacilor vitelini, ouăle se pun în tăvi speciale, prevăzute cu suporturi în care ele se pot aşeza în poziţia dorită (în cazul de faţă cu camera de aer la partea superioară). Se face apoi badijonarea părţii superioare cu tinctură de iod (de două ori). Se taie coaja în jurul bazei camerei de aer, se sparge membrana cochilieră (cu o foarfecă sterilă, flambată în prealabil). Se goleşte conţinutul oului într-o placă Petri sterilă. Se detaşează membrana corioalantoidiană, după care se recoltează sacul vitelin, avîndu-se grija de a se îndepărta pe cît posibil mai mult din gălbenuşul pe care-l conţine. Se face apoi triturarea în mojar sterile sau cu ajutorul omogenizatorului electric. Se suspensionează în soluţia fiziologică (un sac vitelin la 20 ml soluţie fiziologică). Suspensia obţinută se formolează 2‰ şi se ţine 6—10 zile la +4°C pentru inactivare. După acest interval, suspensia se tratează cu eter sulfuric în părţi egale, într-o pîlnie de separaţie, pentru extracţia grăsimilor şi îndepărtarea resturilor celulare. Se lasă în repaus 24 de ore la +4°C. Stratul apos ce se alege la partea inferioară a pîlniei conţine în suspensie corpii rickettsieni (antigenul corpuscular şi fragmente inframicroscopice din stratul periferic capsular al rickettsiilor, deci antigenul solubil). Separarea celor două antigene se face prin centrifugarea stratului apos, timp de o oră la 18 000 turaţii/minut. După centrifugare, antigenul solubil rămîne în lichidul supernatant, care este decantat şi titrat, iar corpii rickettsieni se depun sub forma unui sediment la fundul tubului. Prepararea antigenului corpuscular se face prin resuspendarea acestui sediment în cîteva ml soluţie fiziologică. Antigenul astfel preparat este stabil mai multe luni, dacă conservarea se face în condiţii corespunzătoare (steril, la întuneric şi rece).

În practica obişnuită, pentru RFC se folosesc suspensii antigenice conţinînd atît antigen solubil cît şi corpuscular, fiind mai uşor de preparat.

În cazul antigenului ornitozic, suspensia de sac vitelin se încălzeşte 30 de minute la 100°C. După răcire se adaugă eter în raport de 1/10, se omogenizează şi se lasă la frigider la +4°C timp de 2 ore. Fraţiunea eterică, de culoare galbenă, se recoltează într-un balon cu tubulură laterală şi cu perle, iar suspensia de saci vitelini se supune unei a doua extracţii cu eter în raport de 1/3 timp de o oră. Se amestecă apoi cele două fracţiuni, iar eterul se evaporă la baia de apă. Pe fundul tubului, rămîne un praf galben, peste care se adaugă acetonă pură, încălzită la 55°C, în volum egal cu cantitatea de eter folosită iniţial. Se agită bine lăsînd totul la baia de apă la 55°C timp de o oră. După aceasta acetona se decantează, iar resturile ei se îndepărtează la baia de apă la 37°C. Sedimentului rămas i se adaugă o soluţie salină tamponată la pH 7,1 cîte 5 ml pentru ficare sac. Omogenizarea se realizează prin agitare cu perle. Antigenul este un lichid opalescent de culoare albă lăptoasă. Se repartizează în flacoane sterile şi se mertiolează 1/10 000.

În cazul infecțiilor cu *R. mooseri* (tipul murin) antigenul rickettsian se prepară din țesuturi pulmonare de șoarece sau iepure. În acest scop, în faza maximă a pneumoniei animalelor inoculate pe cale respiratorie cu material virulent, se face recoltarea pulmonilor, triturarea și suspensionarea în soluție fiziologică tamponată și formolată 0,2%. Un pulmon de șoarece cântărind 300 mg este diluat în 20 ml lichid. Pentru purificare, se decantează țesuturile triturate cu ajutorul unui tub de 17 mm, la 44°C, timp de 8 zile. Rickettsiile vor rămâne în suspensie.

Examenul histopatologic

Diferite stări de boală provocate de procese infecțioase, tulburări de metabolism, intoxicații, carențe, tumori etc. se soldează cu instalarea unor alterații tisulare sau celulare, capabile prin natura lor să furnizeze importante date pentru diagnostic. Uneori, aceste modificări sînt atît de caracteristice încît permit, chiar numai prin interpretarea lor, punerea unui diagnostic de certitudine (turbare, tuberculoză, morvă).

Pentru a efectua un examen histopatologic corect, de o deosebită importanță este recoltarea materialului patologic de examinat. Aceasta se poate face, așa cum s-a amintit, de la animalele în viață, sacrificate în scop de diagnostic și după moarte.

Recoltarea pe animalul viu se poate face prin biopsie și prin raclaj (suprafețele cutanate, mucoase) și are avantajul că permite interpretarea modificărilor fără a interveni procesele de alterație postmortală și fără a pierde animalul.

Recoltarea prin sacrificarea în scop de diagnostic are, pe lîngă avantajul că prelevarea pieselor se poate face imediat, evitîndu-se deci procesele alterative și avantajul că se pot recolta țesuturi care pe animalul viu nu sînt accesibile (creier, glande cu secreție internă, organe, se-roase).

Recoltarea pe animalul mort trebuie să se realizeze cît mai curînd după moarte (primele 15 minute dacă e posibil) pentru același motiv — de a se evita modificările structurale cauzate de alterațiile cadaverice.

În orice recoltare, se va evita utilizarea de instrumente neascuțite, strivirile de țesuturi prin compresiune și tracțiuni, iar piesele vor avea mărimi care să permită o bună prelucrare ulterioară (3—5 mm grosime și 1—3 cm lățime).

Examinarea acestor piese se poate face în stare proaspătă sau după o prealabilă fixare pe cale chimică.

Examinarea în stare proaspătă se poate face:

- între lamă și lamelă;
- prin compresiune între două lame (de exemplu examenul trichineloscopic);
- în picătură suspendată (cameră umedă, mai rar folosită în histopatologie);
- prin secțiuni congelate.

Dintre acestea mai importantă din punct de vedere histopatologic este examinarea secțiunilor obținute cu ajutorul microtomului la gheață.

Țesuturile proaspete fiind prea moi nu s-ar putea secționa ca atare în secțiuni foarte subțiri. Prin congelare însă, datorită apei pe care o conțin, ele dobîndesc o consistență crescută și se pot obține secțiuni foarte subțiri, transparente, examinabile ca atare, prin contrast de fază sau prin colorare ulterioară, permițînd o bună examinare a modificărilor existente. Această metodă prezintă avantaje deosebite în următoarele cazuri:

- în situațiile de urgență, cînd se impune stabilirea cît mai precoce a diagnosticului (de exemplu, în oncologie, pentru precizarea naturii unei tumori, în diagnosticul turbării etc.), rezultatele putînd fi obținute în 15—30 minute;

- cînd se urmărește evidențierea unor componente tisulari sau celulari care pot fi solubilizați de către reactivii utilizați în prelucrările premergătoare includerii pieselor (grăsimi, lipoizi);

- pentru unele cercetări de histologie, care nu permit tratarea prealabilă cu diferite substanțe chimice;

- cînd secțiunile urmează să fie colorate sau impregnate prin metode speciale.

Principiul secționării prin congelare se bazează pe absorbția masivă de căldură în momentul trecerii în stare de vapori a unui gaz lichefiat (acid carbonic) aflat sub presiunea de cca 60 atmosfere într-o bombă specială cu robinet. Prin detenta bruscă a bioxidului de carbon rezultat, se produce congelarea foarte rapidă a pieselor.

Bomba cu acid carbonic este pusă în legătură cu microtomul de congelare într-un tub metalic perfect închis cu ajutorul unui robinet. Bomba se așază pe un suport special, cu robinetul în jos (niciodată cu robinetul în sus).

Microtomul de congelare este prevăzut cu un portobiect reglabil, putînd fi ridicat sau coborît prin intermediul unei manivele.

În timpul secționării, avansarea pe verticală a portobiectului se face automat, prin intermediul dispozitivului micrometric. Fiecare cursă completă a cuțitului realizează ridicarea portobiectului cu un număr de microni, în prealabil fixat prin dispozitivul micrometric.

Cuțitul se fixează pe un suport special, situat deasupra portobiectului, executînd mișcări orizontale în timpul secționării. El este de asemenea mobil în jurul unui ax și poate fi mișcat în arc de cerc cu ajutorul unui miner prelungitor, ceea ce permite orientarea lui sub un unghi corespunzător față de piesa fixată pe portobiect.

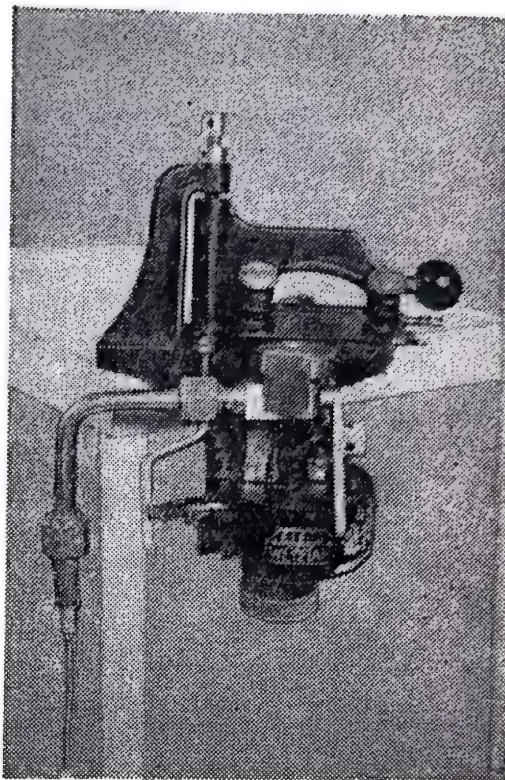


Fig. 105 — Microtomul manual de secționare la gheață

Tehnica secționării la gheață

În primul rînd, se pune pe portobiect o rondelă de hirtie de filtru îmbibată cu apă, pe care se așază apoi piesa ce urmează a fi secționată, orientîndu-se într-o poziție convenabilă.

Se deschide robinetul bombei de acid carbonic, după care se deschide pentru cîteva secunde robinetul de gaz al microtomului, realizînd în acest fel răcirea portobiectului și fixarea piesei de acesta, prin congelarea apei existente pe suport.

Pentru congelarea propriu-zisă a piesei, aceasta se acoperă cu un recipient de sticlă sau material plastic (pahare sau capace de la pahare Borel) și se acționează din nou robinetul de gaz, prin deschideri și închideri succesive, de scurtă durată, pînă cînd piesa este bine acoperită cu gheață carbonică ce se formează. Este necesar să se realizeze o congelare optimă a piesei, în sensul de a nu fi nici prea congelată dar nici insuficient congelată. Acest lucru se constată prin tatonări (secționări de probă). Congelarea prea puternică face ca piesele să devină sfărîmicioase la secționare, în timp ce congelarea insuficientă a acestora are ca rezultat obținerea unor secțiuni prea groase și neuniforme. Aceste deficiențe pot fi corectate în primul caz așteptînd ca piesa să se mai dezghețe și apoi, se reîncepe secționarea, sau repetînd operațiunea de congelare, în cel de al doilea caz.

În vederea secționării propriu-zise, se ridică portobiectul pînă cînd suprafața piesei fixate pe el este foarte aproape de cuțit, dar nu atît de aproape încît acesta să taie de la prima acționare (există riscul de a pierde o porțiune importantă din piesă), avînd în vedere că pentru început, dispozitivul micrometric se fixează pentru un grosiment mai mare (50—100 microni). După ce se constată că s-a pătruns suficient în piesă, se reglează definitiv dispozitivul micrometric la numărul de microni la care se dorește să se obțină secțiunile (trebuie menționat că este destul de dificil să se obțină secțiuni mai subțiri de 10 microni, mai ales dacă este vorba de țesuturi cu consistență mai mare). Pentru a obține secțiuni uniforme, la o anumită grosime, trebuie să imprimăm cuțitului mișcări destul de rapide, la curse complete, asigurînd în acest fel acționarea uniformă a dispozitivului micrometric. În caz contrar, se obțin secțiuni neuniforme ca grosime. O cursă completă a cuțitului realizează o singură secțiune.

Dacă în timpul secționării se constată că piesa și-a pierdut din consistența realizată prin congelare este necesar ca ea să fie recongelată.

Secțiunile obținute se culeg una cîte una, cu pulpa degetului umezită, cu grijă să nu fie strivite și se depun într-un vas cu apă distilată (plăci Petri, capace de la pahare Borel, sticle de ceasornic sau cristali-zoare). În contact cu apa, secțiunile se dezgheață și se întind, putîndu-se astfel aprecia calitatea lor. Se înțelege că dacă piesele aparțin unor cazuri diferite, secțiunile vor fi repartizate în recipiente separate, avînd grija de a le individualiza.

În mod normal, secțiunile la gheață trebuie prelucrate în continuare (colorate etc.) în următoarele ore, pentru că menținute prea mult timp în apă se deteriorează. Dacă acest lucru nu este posibil, atunci vor fi păstrate fie într-o soluție de formol 10%, fie la frigider, dar nici în acest caz nu mai mult de 1—2 zile.

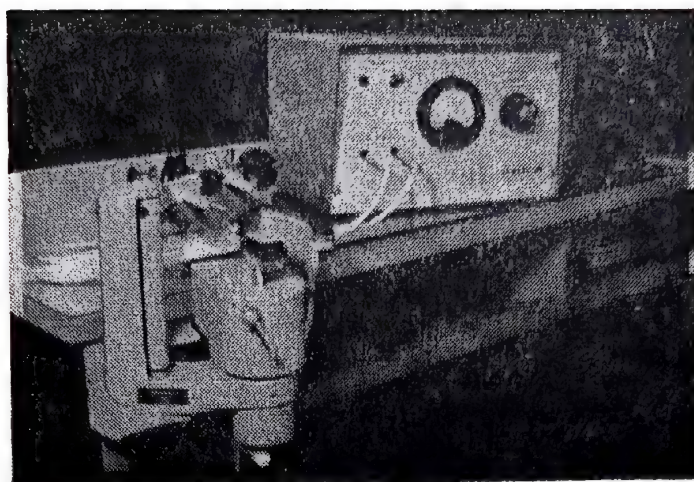


Fig. 106 — Microtom electric de secționare la gheață

După ce operațiunea de secționare s-a terminat, se închide robinetul bombei cu acid carbonic, deschizându-se însă robinetul microtomului, pentru evacuarea gazului rămas pe tuburi, după care și acest robinet va fi bine închis.

Examenul pe țesuturi fixate

Datorită faptului că țesuturile în stare proaspătă nu oferă preparate de durată, ele alterându-se foarte repede după recoltare, s-a recurs la fixarea lor prin metode chimice, care realizează oprirea bruscă a manifestărilor vitale și conservarea structurilor în faza în care erau în momentul recoltării. Fixarea ajută totodată la diferențierea optică a diferitelor părți constitutive ale țesuturilor și celulelor, prin folosirea substanțelor colorante. Agenții fixatori chimici pot fi folosiți singuri sau în combinații complexe. O condiție esențială, indiferent de formula în care se folosesc, este ca ei să păstreze o structură cât mai apropiată de cea din starea vie. De asemenea, ei trebuie să aibă capacitatea de a pătrunde în profunzimea țesuturilor, pentru a realiza o fixare uniformă a întregii mase tisulare de examinat. Cu cât acești fixatori pătrund mai repede în profunzime, cu atât țesuturile sînt surprinse într-o stare mai puțin modificată. Fixatorul mai trebuie să fie ușor acid (cei alcalini ar produce modificări și înmuierea pieselor), să întărească moderat piesa și, în sfîrșit, să permită colorația ulterioară.

Cantitatea de fixator trebuie să fie în general de 50—100 de ori mai mare decît a piesei. Durata de fixare este variabilă cu soluția fixatoare, cu grosimea și natura piesei de fixat. Ea durează în general de la cîteva ore pînă la cîteva zile.

După proveniență și după proprietățile lor chimice, fixatorii se împart în mai multe categorii:

- fixatori acizi minerali (acidul osmic);
- fixatori organici (acidul acetic, picric);

- fixatori reducători (alcoolul etilic, metilic, formolul);
- săruri ale metalelor grele (biclorura de mercur, bicromații).

Din alt punct de vedere, fixatorii pot fi:

- amestecuri apoase (formolul, lichidul Bouin, Orth etc.);
- amestecuri anhidre (alcool absolut, acetonă, lichidul Carnoy etc.).

Dintre toți aceștia cel mai larg folosit în practica histopatologică și în același timp cel mai economic este formolul. El este un bun pătrunzător, păstrează foarte bine structurile și permite colorații ulterioare, chiar după o acțiune mai îndelungată. În plus, prin fixarea cu formol, grăsimile și lipoizii nu sînt dizolvați, fapt care-l face să fie întrebuințat în cercetările de histopatologie și pentru studiul sistemului nervos. Concentrația în care se utilizează este de 4—10% în apă de robinet sau distilată.

Dintre fixatorii compuși pot fi amintiți cîțiva care sînt mai frecvent folosiți: lichidul Flemming (conține acid cronic, osmic și acetic), lichidul Bouin (conține acid picric, formol, acid acetic) lichidul Müller (cu bicromat de potasiu și sulfat de sodiu), lichidul Carnoy (cu alcool absolut, cloroform și acid acetic), lichidul Orth (cu lichidul Müller și formol) etc. După fixarea în asemenea fixatori, este necesar să se facă o spălare temeinică a pieselor, pentru ca substanțele respective să nu atace cuțitele și celelalte piese ale microtomului.

Trebuie menționat că în vederea secționării la gheață, piesele fixate în amestecuri apoase trebuie să fie spălate temeinic cu apă curentă înainte de congelare, pentru a evita sfărîmarea lor în timpul secționării, din cauza urmelor de fixator. Dacă s-au folosit fixatori anhidri (de exemplu lichidul Carnoy) piesele vor fi supuse unei rehidratări înainte de congelare.

Pentru o mai bună incluzie și ulterior secționare, este bine ca piesele introduse în fixator să fie modelate după 24—48 ore de fixare. Operațiunea se face cu instrumente bine ascuțite sau cu lame de bărbierit, imprimîndu-se piesei o formă geometrică definitivă pentru incluzie și renunțîndu-se, eventual, la segmentele care nu sînt necesare. Prin aceasta se facilitează și pătrunderea în continuare a fixatorului în profunzimea țesuturilor și manipularea mai facilă atît în cursul secționării, cît și al operațiunilor ulterioare acesteia.

Amestecuri fixatoare apoase:

1 — Soluția de formol 1/4

- formaldehidă 40% p.a. — o parte
- apă robinet — 4 părți

2 — Lichidul Bouin

- soluție saturată apoasă de acid picric — 15,0 ml
- formaldehidă 40% p.a. — 5,0 ml
- acid acetic glacial — 1,0 ml

Se prepară ex tempore. Durata fixării: 12—24 ore.

Nu este indicat pentru organele hematopoetice din cauza acidului picric care hemolizează eritrocitele. Nu conservă grăsimile.

3 — Amestecul Flemming (cromoacetoosmic)

- acid cronic 1% 15,0 ml
- acid osmic 2% 4,0 ml
- acid acetic glacial 1,0 ml

Se prepară ex tempore. Pentru a nu se altera acidul osmic este bine să se dizolve 0,5 g tetraoxid de osmiu în 118,7 ml acid cromic 10%. În momentul folosirii, se adaugă 1 ml acid acetic glacial la 19 ml amestec.

Avînd o slabă difuzibilitate în ţesuturi, nu se pretează decît pentru piese subţiri de cca 3 mm.

4 — *Lichidul Müller*

- | | |
|-----------------------|----------|
| — bicromat de potasiu | 2,0 g |
| — sulfat de sodiu | 1,0 g |
| — apă distilată | 100,0 ml |

5 — *Lichidul Orth*

- | | |
|------------------|---------|
| — lichid Müller | 9 părţi |
| — formol 40 vol. | 1 parte |

Durata fixării: 24—48 ore. După fixare, piesele se vor spăla cu apă curentă timp de 24 de ore.

6 — *Lichidul Dubosq-Brazil*

- | | |
|-----------------------|----------|
| — acid picric | 1,0 g |
| — alcool 80° | 150,0 ml |
| — formol conc. | 60,0 ml |
| — acid acetic glacial | 15,0 ml |

Acidul picric se dizolvă în alcool, iar formolul şi acidul acetic se adaugă înainte de folosire. După fixare, piesele se trec direct în alcool 90%. Este foarte indicat în coloraţiile pentru incluzii uratice.

7 — *Lichidul Zenker*

- | | |
|-----------------------|----------|
| — bicromat de potasiu | 2,5 g |
| — apă | 100,0 ml |
| — sublimat | 5,0 g |
| — sulfat de sodiu | 1,0 g |

La întrebuintare se adaugă 5% acid acetic glacial. Este indicat pentru cercetări histologice generale şi mai ales pentru parenchime glandulare. Durata fixării este de 6—48 ore, după grosimea pieselor. Pătrunde foarte bine în ţesuturi şi favorizează toate coloraţiile. O fixare prelungită alterează nucleii, dar evidenţiază unele organite citoplasmatice.

Amestecuri fixatoare anhidre:

Lichidul Carnoy

- | | |
|------------------|--------|
| — alcool absolut | 6,0 ml |
| — cloroform p.a. | 3,0 ml |
| — acid acetic | 1,0 ml |

Se prepară ex tempore. Durata fixării: 2—4 ore (pentru piese cu grosimea de 2—3 mm).

Amestec alcoolic

- | | |
|-------------------------|---------|
| — alcool metilic | 3 părţi |
| — alcool etilic absolut | 1 parte |

Durata fixării: 12 ore

Piesele fixate pot fi secţionate la rîndul lor prin congelare sau după incluzia în alte materiale special destinate acestui scop.

Metode de incluzie

Secționarea după o prealabilă incluzie prezintă o serie de avantaje față de metodele de examinare a pieselor în stare proaspătă sau după secționarea la microtomul de congelatie. În primul rând, se obțin secțiuni mult mai fine (2—5 microni), în al doilea rând se pot secționa piese foarte mici, în al treilea, permite secțiuni seriate și examinări de finețe citologică, iar în al patrulea manipularea pieselor se face cu ușurință.

Metodele de incluzie se împart în două categorii: în medii apoase și medii anhidre

a) *Mediile apoase* se folosesc mai puțin, manipularea pieselor fiind greoaie. Dintre ele pot fi amintite guma arabică, săpunul, gelatina.

b) *Mediile anhidre* sînt cel mai larg folosite în practica actuală. Acestea presupun însă o prealabilă deshidratare a pieselor, impregnarea lor cu solvenți ai mediului și, în final, înglobarea în mediul respectiv. Dintre acestea cele mai folosite sînt celoidina, parafina, iar în ultimul timp, din ce în ce mai larg folosite, substanțele care polimerizează.

1 — **Incluzia în celoidină.** Celoidina — o nitroceluloză transparentă, elastică și solubilă în alcool și eter — se folosește pentru incluzii la rece.

Fiind un mediu anhidru, se impune ca piesele să fie în prealabil deshidratate. În acest scop, piesele fixate și spălate se introduc în băi succesive de alcool etilic de concentrații crescînde (50°, 70°, 90°, 96° și două băi de alcool absolut). Durata șederii pieselor în fiecare baie este variabilă cu natura piesei și volumul ei. Pentru piesele de 1—2 mm fiecare baie necesită 1—2 ore, în timp ce pentru cele de 4—5 mm se prelungește la 4—5 ore.

Urmează apoi impregnarea pieselor cu alcool absolut + eter sulfuric (în părți egale) timp de 4—5 ore și, în fine, impregnarea cu soluția de celoidină 2%, 4% și 8%.

Prepararea soluțiilor de celoidină se face din plăci de celoidină care se găsesc în comerț, fragmentate cît mai mărunt și amestecate cu alcool + eter. De exemplu, pentru prepararea soluției 2%, se pun 20 g celoidină în 500 ml alcool absolut. După 24 de ore se adaugă 500 ml eter. Pentru a grăbi dizolvarea, din timp în timp, se agită recipientul respectiv. Celelalte soluții se prepară în același mod, doar mărind proporția de celoidină, la 4 și respectiv 8%.

Impregnarea are loc în vase mici, bine închise, în care se pun soluțiile de celoidină și în care se trec pe rînd piesele după impregnarea cu alcool absolut + eter. Cantitatea de celoidină a fiecărei băi trebuie să fie astfel aleasă încît să acopere piesele.

Durata impregnării este variabilă cu grosimea și natura pieselor: pentru cele de 2—3 mm este de 48 ore, în timp ce pentru cele de 4—5 mm se prelungește pînă la 3—7 zile. O ședere mai îndelungată în soluția de celoidină nu este dăunătoare.

Incluzia propriu-zisă se face în soluția de celoidină 8%, într-un recipient cu fund plat, variabil ca mărime după numărul pieselor ce urmează a fi incluse, cu grija ca celoidina să depășească înălțimea pieselor cu cca 2 cm.

Recipientul se așază apoi într-un vas mai mare, care conține acid sulfuric și totul se pune sub un clopot de sticlă suficient de mare. După două ore, se retrage vasul cu acid sulfuric, lăsându-se numai cel cu celoidină. În această stare, piesele se lasă pînă la întărirea celoidinei datorită evaporării solvenților acesteia. Pentru a grăbi evaporarea, eventual, din două în două ore se ridică pentru cîteva minute clopotul de sticlă. Incluzia este terminată cînd celoidina s-a întărit la consistența unui cauciuc moale. Pentru a o întări și mai mult, se pune vasul cu celoidină în altul conținînd alcool 70° timp de 12—24 de ore. La sfîrșit, celoidina se taie în blocuri, cu grija ca în jurul pieselor să rămînă un strat de 2—3 cm celoidină. Pînă la secționare blocurile se păstrează în alcool de 70°.

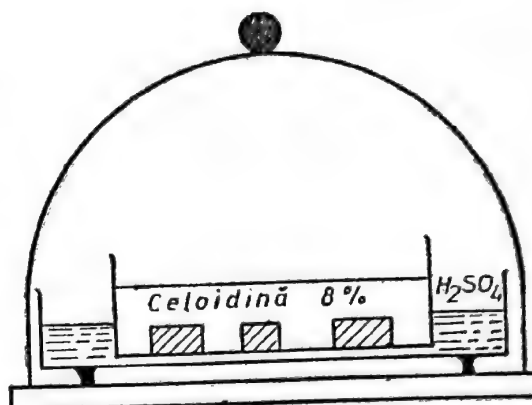


Fig. 107 — Incluzia la celoidină

2 — Incluzia în parafină. Parafina obținută în procesul de distilare a petrolului este foarte larg folosită în laboratoarele de histopatologie pentru ușurința cu care se manipulează, pentru consistența ei care permite secționarea în condiții foarte bune.

Pentru lucrările de histopatologie, se pretează cel mai bine parafina transparentă cu punctul de fuziune situat între 54—56° (se evită parafina opacă, a cărei temperatură de topire este de 51—54°C). Pentru înlăturarea impurităților și a componentilor greu fuzibili este bine ca parafina să se fiarbă în apă 1—2 zile, stratul superficial înlăturîndu-se.

Tehnica de incluzie în parafină presupune următorii timpi:

a) *Deshidratarea piesei* se face în băi de alcool etilic de concentrații crescînde (50°, 70°, 90°, 96° și alcool absolut).

Durata șederii în aceste băi deshidratante este variabilă după natura și volumul pieselor, în general 1 oră pentru fiecare mm de grosime.

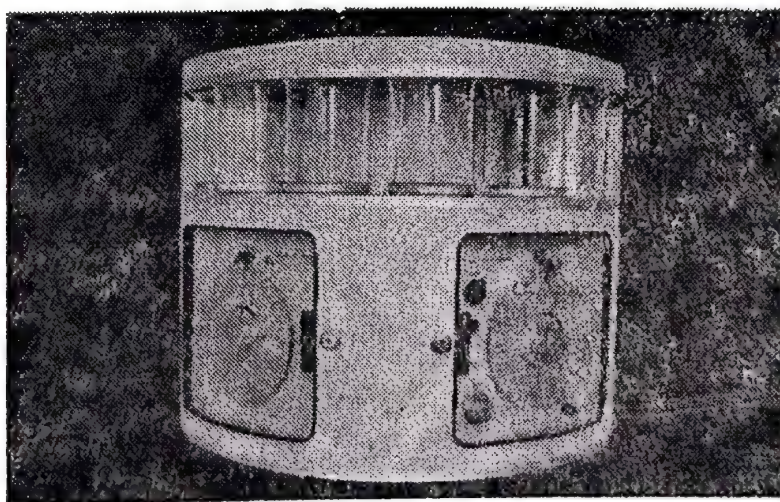


Fig. 108 — Dispozitiv automat de incluzie la parafină

Băile se pregătesc în borcane cu dop șlefuit, pe fundul cărora se pune câte o rondelă de hîrtie de filtru sau un suport metalic, înalt de 1—2 cm.

b) *Impregnarea cu solvenți ai parafinei* (clarificarea) urmărește înlocuirea alcoolului din piese cu un solvent care este miscibil cu parafina. Cel mai bun solvent este benzolul, dar pot fi folosite și toluolul, xilolul, clorofomul. În acest scop se trece piesa deshidratată prin 2—3 băi de solvent, în vase bine închise. Dacă piesa nu este bine deshidratată în momentul introducerii ei în solvent se produce o diră albicioasă. Dacă deshidratarea s-a făcut corect, piesa devine translucidă, mai întii spre periferie, apoi din ce în ce mai mult spre centru. Durata băilor de clarificare depinde, ca și a celor de deshidratare, de grosimea și consistența piesei. De regulă, ea oscilează între 30 și 90 minute. O prelungire a timpului de clarificare se soldează cu întărirea exagerată a țesuturilor, acestea devenind sfărîmicioase la secționare.

c) *Impregnarea cu parafină* trebuie făcută treptat ca și în cazul celorlalte operațiuni. O primă baie cu amestec de benzol + parafină în părți egale, la 37°C, este urmată de 3 băi cu parafină pură încălzită la 56°C prin care piesele sînt trecute succesiv, cu ajutorul unor instrumente încălzite și ele (prin ținerea lor în etuva de 56°C). Durata acestor băi depinde și ea de dimensiunile piesei, fiind de 1—3 ore în cazul primelor băi și de 1/2 oră în cazul ultimei băi. Dacă este vorba de țesuturi foarte ușor penetrabile (creier) durata de menținere în aceste băi se scurtează. În general se poate lua ca durată medie a fiecărei băi, o oră pentru fiecare milimetru grosime.

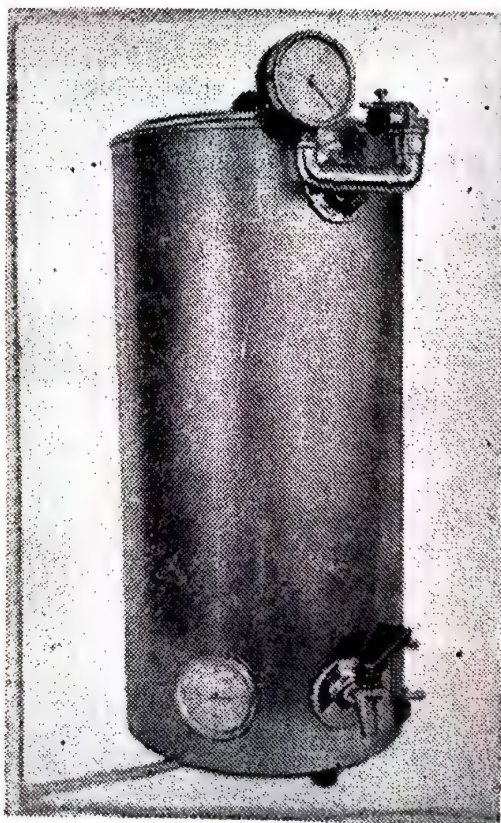


Fig. 109 — Rezervor pentru parafina topită

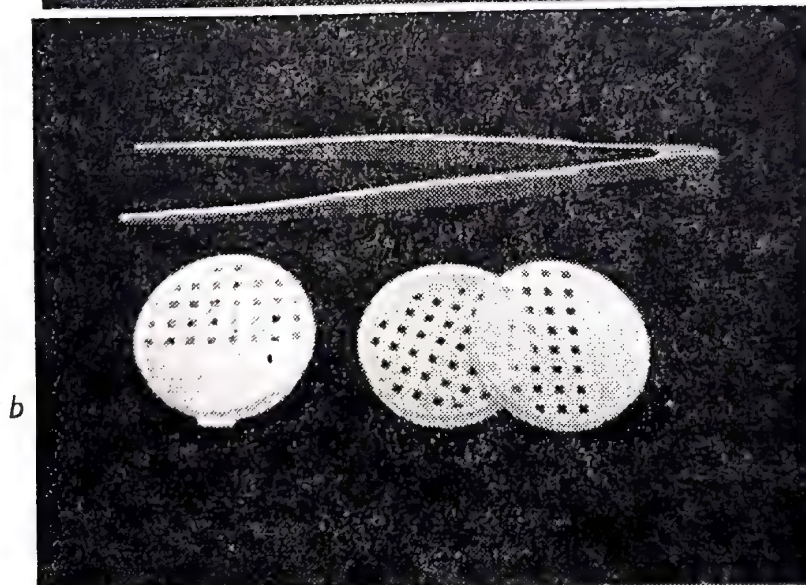
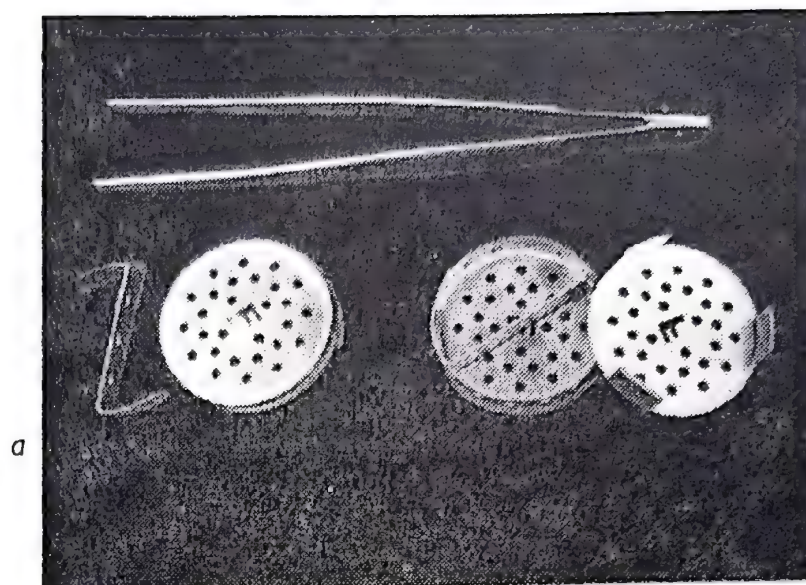
Menționăm că parafina care se folosește în acest scop trebuie amestecată cu ceară de albine (3—5% ceară) pentru a nu fi sfărîmicioasă la secționare. Este recomandabil ca ceara să fie de cea mai bună calitate, recurgîndu-se eventual, ca și în cazul parafinei, la fierberea ei în apă; stratul superficial, conținînd impurități, se înlătură.

Amestecarea cu parafină se face la cald, recurgîndu-se apoi la supraîncălzire timp de 15 minute, urmată de filtrare. Cantitatea necesară pentru impregnări se păstrează în vase închise la etuva de 56°C. În principiu, o parafină cu cît se topește de mai multe ori cu atît este mai bună pentru secționare.

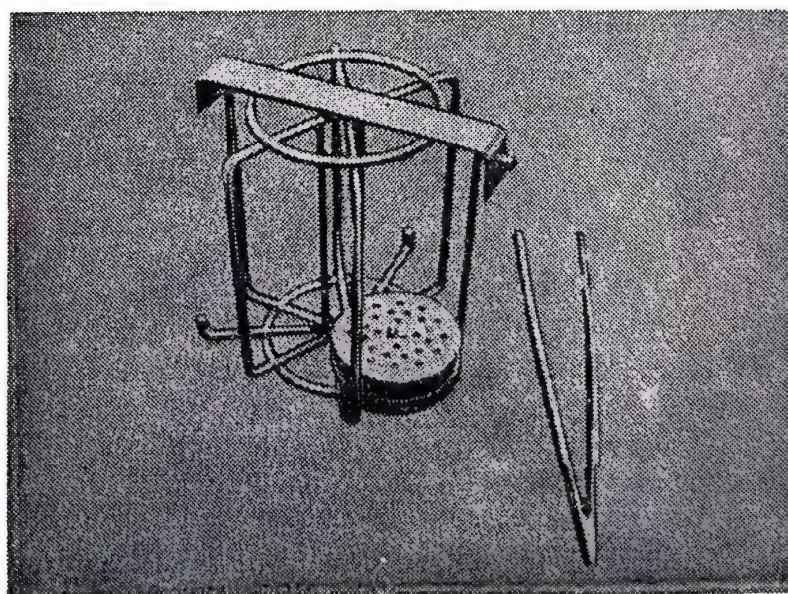
d) *Incluzia propriu-zisă* constă în înglobarea piesei impregnate în parafină, care apoi se solidifică prin răcire. Această operațiune se face în vase metalice, în dispozitive cu rame metalice sau în staniol modelat sub formă de vas. Dacă e vorba de vase (forme) metalice, ele trebuie să aibă înălțimea pereților de 2 cm și suprafața variabilă

*Fig. 110 — Capsule pentru
fixarea și incluzia la para-
fină a pieselor histopatolo-
gice*

*a — metalice; b — din material
plastic*



*Fig. 111 — Suportul pentru
capsule adaptabil la auto-
matul de incluzie*



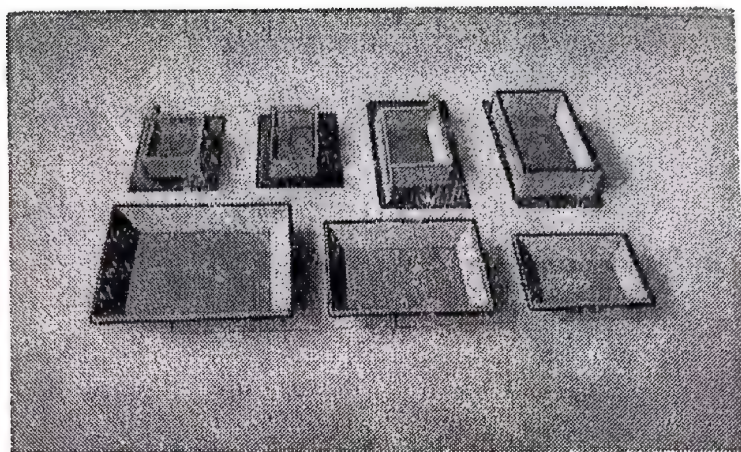


Fig. 112 — Tăvi metalice pentru incluzia la parafină

în funcție de numărul pieselor ce se includ. Ele se încălzesc la flacără cu ajutorul unei pense, pînă la $70-80^{\circ}\text{C}$, după care se toarnă dintr-un vas cu parafină topită la 56°C o cantitate care să depășească cu circa 5 mm înălțimea pieselor ce urmează a fi incluse (grosimea totală a stratului este de cca 1,5 cm). Apoi, cu o pensă ușor încălzită se pune piesa din ultima baie de parafină, în parafina turnată în formă. Parafina fiind lichidă, permite aranjarea piesei în poziția dorită pentru secționare. Se va căuta ca suprafața de secționare a piesei să vină pe fundul vasului, deoarece acolo va începe secționarea. Pentru identificarea pieselor incluse se vor pune în dreptul fiecăreia din ele, fișii de hirtie pe care se scrie cu un creion negru indicativul respectiv. Se solidifică apoi parafina, de preferință cît mai repede, utilizîndu-se un vas cu apă rece în care se scufundă forma, pentru ca ea să devină cît mai puțin sfărîmicioasă. După 15—30, minute parafina solidificată se scoate din formă și se secționează în blocuri de mărimi variabile, în funcție de cele ale piesei, restul pa-

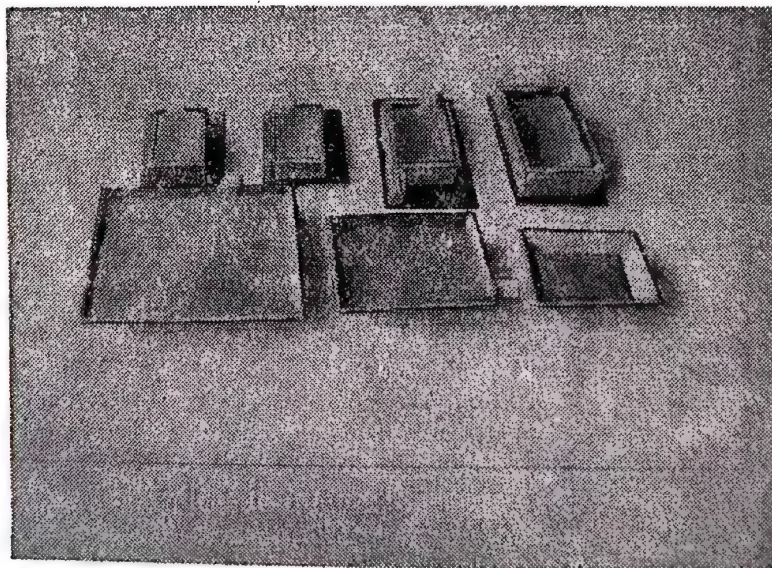


Fig. 113 — Incluzia în tăvi și forme metalice

rafinei reutilizându-se pentru incluzii ulterioare. Blocul cu piesa inclusă trebuie să fie omogen, fără bule de gaze sau impurități. În cazul că este lipsit de omogenitate sau orientarea piesei nu este bine făcută, se recurge la reincluzie.

Păstrarea blocurilor de parafină cu piesele incluse se face în cutii de lemn sau carton, la adăpost de praf.

În laboratoarele de histopatologie moderne, se folosesc la ora actuală aparate automatizate, care efectuează conform unor programe prestabilite trecerea pieselor prin diferitele băi de deshidratare și impregnare la intervalele dorite. În acest fel, se economisește mână de lucru și se asigură corectitudinea succesiunii acestor lucrări. De asemenea, pentru păstrarea parafinei topite, există rezervoare termoreglabile, din care parafina topită se poate folosi în momentul dorit, prin simpla deschidere a unui robinet.

3 — Incluzia în celoidină-parafină este o combinație de metode de incluzie care reunește avantajele ambelor procedee și anume permite cele mai fine secțiuni (până la 1 micron) și ale pieselor compuse din țesuturi foarte variate (de exemplu globul ocular) sau cu goluri mari (de exemplu traheea). Este mai costisitoare și durează mai mult.

Principiul constă în incluzia piesei în celoidină, impregnarea blocului de celoidină și apoi incluzia în parafină. Schematic tehnica constă în următoarele:

- deshidratarea pieselor până la alcool absolut
- impregnarea cu alcool absolut + eter
- impregnarea în celoidină 2,4 și 8%
- incluzia propriu-zisă în celoidină 8% în vapori de cloroform (nu în alcool 70° ca la incluzia în celoidină simplă)
- efectuarea blocurilor de celoidină și întărirea mai departe 24 de ore în cloroform
- deshidratarea completă a blocului de celoidină timp de 24 de ore într-un amestec uleios deshidratant (cloroform 4 părți, *oleum origani* 4 părți, oleu de cedru 4 părți, alcool absolut 1 parte, fenol cristalizat 1 parte); deshidratarea completă este indicată de clarificarea completă a piesei și de căderea ei la fund
- impregnarea cu benzol, 2—3 băi
- impregnarea cu parafină 24 de ore la 56—60°C
- incluzia propriu-zisă a blocului de celoidină în parafină, se face între 2 lame de sticlă, pentru a-i forma două suprafețe plane (una de secționare și una pentru fixare pe portobiect).

Blocurile de celoidină-parafină se păstrează ca și cele de parafină.

Secționarea

Blocurile conținând piesele incluse se secționează cu ajutorul unor aparate special destinate acestui scop — microtoame, de diferite tipuri și fabricații. Deplasarea portobiectului se face în plan orizontal sau vertical, după tipul microtomului respectiv.

În cazul pieselor incluse la celoidină. Blocurile cu piesele incluse se scot din alcoolul de 70° în care se păstrează înainte de secționare și se lipesc pe un portobiect de lemn, în vederea adaptării la microtomul de celoidină. Lipirea se face cu celoidină. Portobiectul este un bloc de lemn de esență tare, avînd o formă cubică sau paralelipipedică, cu dimensiunile de $3 \times 3 \times 2$ cm, cu două suprafețe mai aspre, pentru a permite o bună aderență.

Pe una din suprafețele aspre se toarnă celoidină 80%. Blocul de celoidină se usucă de alcool și se aplică rapid pe portobiectul de celoidină, apăsînd ușor. Se mai toarnă o cantitate redusă de celoidină deasupra întregului bloc și se acoperă cu un clopot de sticlă, punînd alături un vas cu cloroform pentru a grăbi întărirea celoidinei. Lipirea se realizează după cca 15 minute. Urmează apoi fixarea portobiectului împreună cu blocul, în dispozitivul special al microtomului.

Secționarea propriu-zisă se realizează prin mișcarea în plan orizontal a cuțitului, fixat în poziție oblică. Pentru piesele mici se preferă cuțitele plan concave, iar pentru cele mari și dure, cuțitele biplane.

În tot timpul secționării atît suprafața piesei cît și cea a lamei cuțitului se udă cu alcool de 70°. Secțiunile se ridică de pe lama cuțitului cu o pensulă înmuiată în alcool de 70° și se trec în alcool de aceeași concentrație, fiind gata de colorare.

Grosimea secțiunilor ce se poate obține prin această tehnică este de 10—15 microni.

Secțiunile în acest caz nu sînt seriate. Dacă se dorește păstrarea și examinarea lor în serie este necesar ca ele să fie recoltate în vase diferite sau între bucăți de hîrtie de filtru numerotate.

În cazul pieselor incluse la parafină. Se folosesc microtoame cu cuțit fix, portobiectul cu piese efectuînd mișcări succesive în plan vertical și de înaintare spre cuțit. Este metoda cea mai frecvent folosită.

Blocurile de parafină care conțin piesa trebuie să fie ajustate în prealabil, imprimîndu-le o formă de trunchi de piramidă, în care suprafața de secționare este cea superioară. Trebuie avut de asemenea grijă ca laturile blocului să fie paralele pentru ca secțiunile care rezultă să

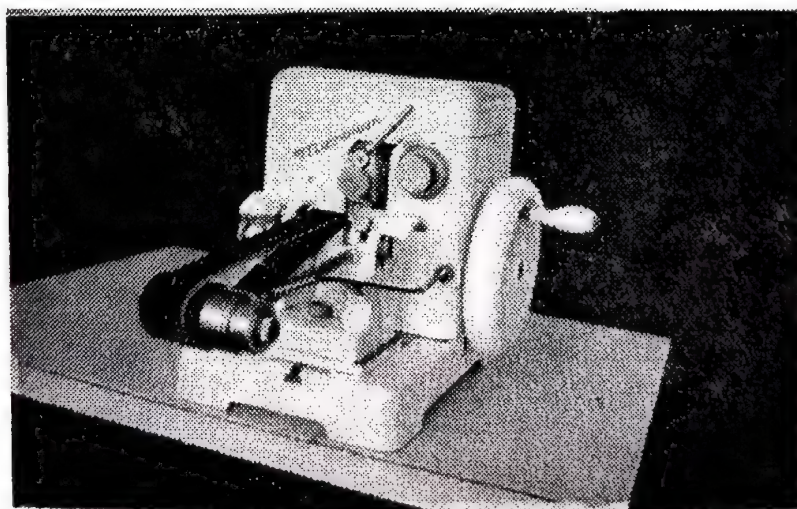


Fig. 114 — Microtom tip IOR de secționare a pieselor histopatologice incluse în parafină

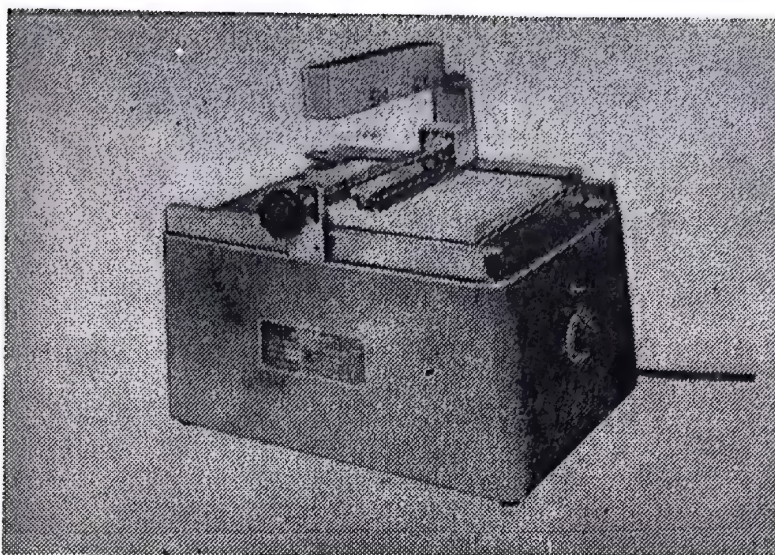


Fig. 115 — Dispozitiv electric pentru ascuțit cuțite de microtom

formeze o panglică seriată dreaptă. Este de preferat ca stratul de parafină lateral să fie cât mai redus, însă între marginile superioară și inferioară ale piesei și blocului este nevoie să rămână un strat de cel puțin 2 mm.

Lipirea blocului pe portobiect se realizează prin încălzirea inițială a acestuia la flacără (se fixează cu un clește sau pensă), după care blocul se compresează ușor pe suprafața de fixare prevăzută cu renuri concentrice pentru o bună aderență. Se poate recurge apoi și la o spatulă încălzită pentru a modela definitiv forma blocului și a realiza o bună aderență a bazei blocului la portpiesă. Imediat se trece totul în apă rece pentru solidificare și deci fixare prin consolidarea parafinei.

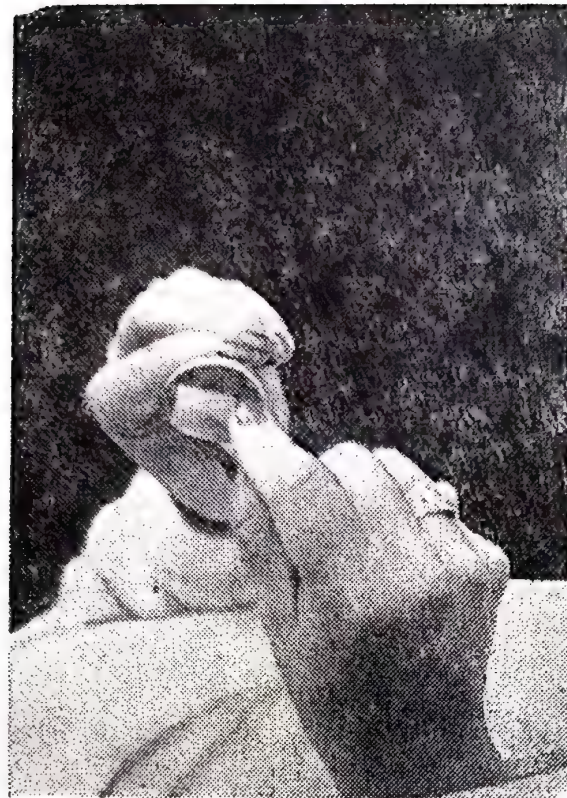
Portpiesa se montează apoi în lăcașul special al microtomului și se orientează de așa manieră ca suprafața dinspre cuțit a blocului să fie paralelă cu cuțitul.

Se potrivește numărul de microni la care se va face secționarea prin rotirea unui disc gradat care reglează pasul de înaintare a portpiesei. Prin rotirea volantului microtomului, după câteva mișcări, vor apărea secțiuni, la început numai cu parafină, iar apoi conținând și porțiuni de piesă. Secțiunile apar seriate sub forma unei panglici, rezultate din aderența marginilor fiecărei secțiuni. Dacă nu se obține o panglică, deci marginile secțiunilor nu aderă una la cealaltă, înseamnă că parafina este prea tare (se va recurge la încălzirea atmosferei ambiante). După ce s-au obținut 10—12 secțiuni, se întrerupe secționarea și, cu două ace de disociat, se ridică panglica depunându-se pe o hîrtie sau carton negru. Așezînd seriile de panglici în ordine se va ști și ordinea secțiunilor putîndu-se, de asemenea, alege cele dorite pentru prelucrarea ulterioară.

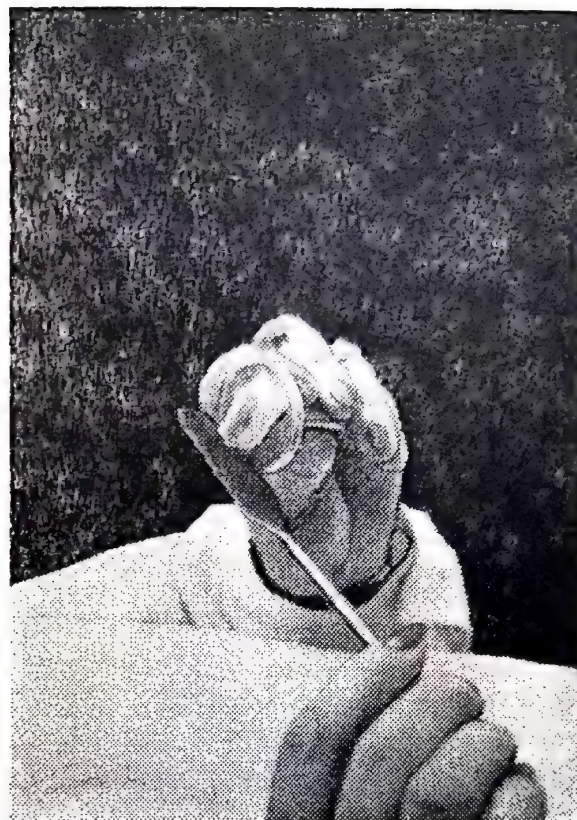
Dacă în timpul secționării parafina din secțiune se desprinde de piesă, înseamnă că în momentul incluziei piesa a fost prea rece și este necesară reincluzia. Cînd piesa se sfărîmă la secționare, locul ei în parafină rămînînd gol, înseamnă că piesa s-a întărit prea mult în cursul manoperelor de incluzie, neavînd aceeași consistență ca și parafina. În acest caz, nu există nici o posibilitate de remediere, piesa fiind pierdută. Dacă în secțiune apar dungi transversale paralele cu tăișul cuțitului, acesta,



a



b



c

Fig. 116 — Lipirea blocului de parafină pe portpiesă
a — încălzirea la flacără a portpiesei; b — lipirea propriu-zisă; c — ajustarea cu spatula încălzită

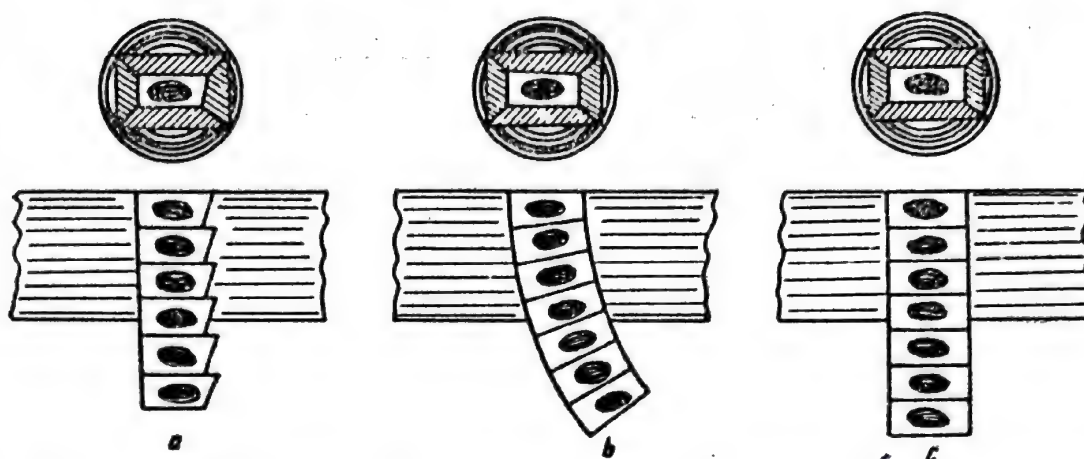


Fig. 117 — Modelarea blocului de parafină în vederea secționării la microtom (a—b) = incorect; c = corect)

blocul sau portpiesa nu sînt bine fixate, rezultînd trepidatii care duc la deteriorarea secțiunilor. Dacă apar dungi perpendiculare pe cuțit și ele traversează toată secțiunea (atît piesa cît și parafina), înseamnă că cuțitul nu este bine ascuțit, prezentînd neregularități care fac „gura” lui să nu fie perfectă. Se recurge la deplasarea laterală a cuțitului, pînă se găsește o zonă corespunzătoare, sau la ascuțirea lui.

În acest context sînt oportune cîteva cuvinte despre îngrijirea cuțitelor de microtom. În primul rînd trebuie subliniat că după fiecare întrebuințare este necesar ca ele să fie curățite. Se va evita secționarea unor piese prea dure (incomplet decalcificate), care determină știrbirea cuțitelor. Pentru ascuțire se folosesc pietre speciale (cel puțin de două calități), cuțitele fixîndu-se în monturi speciale care să asigure o înclinare corespunzătoare a cuțitului față de piatră. La ora actuală există dispozitive automate de ascuțire, acționate electric, prin care se realizează o ascuțire uniformă și de bună calitate.

Verificarea tăișului se face prin examinarea acestuia la microscop. Gura cuțitului trebuie să apară ca o linie dreaptă, fără neregularități, dacă cuțitul este bine ascuțit.

Operațiuni ulterioare secționării

Secțiunile obținute, dacă nu sînt prelucrate imediat, pot fi păstrate în condiții diferite în funcție de metoda prin care au fost secționate. Secțiunile la gheață și gelatină se pot păstra în vase închise în apă distilată sau formolată timp de mai multe zile. Cele în celoidină se păstrează indefinit în alcool de 70° în vase bine închise, iar cele în parafină, ca atare, la adăpost de praf și ferite de căldură.

Pentru prelucrare ulterioară, secțiunile trebuie fixate pe lame de microscop (cele de la gheață se pot colora și fără să fie fixate, însă trecerea lor succesivă prin băi este anevoioasă și expune la degradare prin ruperi și disocieri). Lipirea pe lamă se face cu ajutorul albuminei glicerinate. Aceasta este un amestec în părți egale de glicerină cu albuș de ou.

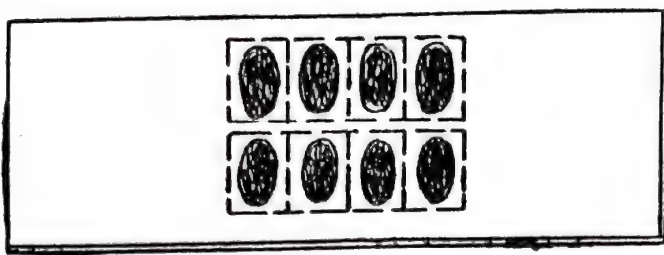


Fig. 118 — Lipirea secțiunilor pe lamă

de filtru se perfectează întinderea și aderența secțiunii pe lamă. Prin introducerea lamei în alcool 90° se realizează precipitarea albuminei și, implicit, lipirea secțiunii.

Pentru a realiza aderența secțiunii la lamă se poate recurge și la încălzirea ușoară a acesteia la flacără, până la coagularea albuminei. Când se urmărește cercetarea grăsimii din țesuturi, în loc de alcool 90° se folosește alcoolul 50°, amestecat cu formol în proporție de 3,5%.

— Secțiunile în celoidină se trec din alcool 70° pe lamă având albumină glicerinată, după care se presează cu o hîrtie de filtru și se adaugă o picătură de oleu de garoafe, iar după 10—20 minute, cînd piesa este clarificată, lipirea este gata.

— Secțiunile în parafină se lipesc de asemenea cu albumină glicerinată. În acest scop, secțiunile alese ca fiind corespunzătoare ca grosime, uniformitate și ca zonă din piesa de cercetat, se așază cu fața lucioasă spre lamă (fața lucioasă este aceea care la secționare era spre tăișul cuțitului). Se adaugă pe lamă cîteva picături de apă distilată în așa fel ca secțiunea să plutească, dar fără a se stropi suprafața secțiunii. Dacă ea prezintă îndoituri, se va întinde cu ajutorul unor ace de disociat, atingîndu-se însă numai marginile de parafină, nu și secțiunea însăși. Se încălzește apoi lama la o flacără sau pe o platină șofantă, pînă cînd secțiunea se întinde complet, fără însă ca parafina să se topească. Se scurge apa în exces, se orientează secțiunile în poziție definitivă și se așază pe un stativ în poziție oblică pentru a se scurge întreaga cantitate de apă de pe lamă. Uscarea se efectuează fie la temperatura camerei (6—24 ore), fie la termostat la 37°C cîteva ore, fie la termostatul de

— Secțiunile la gheață se introduc înainte de lipire timp de 10—15 minute în alcool 70° pentru a fi ușor întărite. Apoi se întinde cu pulpa degetului un strat subțire de albumină glicerinată pe lama de microscop și se culeg 1—2 secțiuni cu ajutorul acelor de disociat. Cu o hîrtie

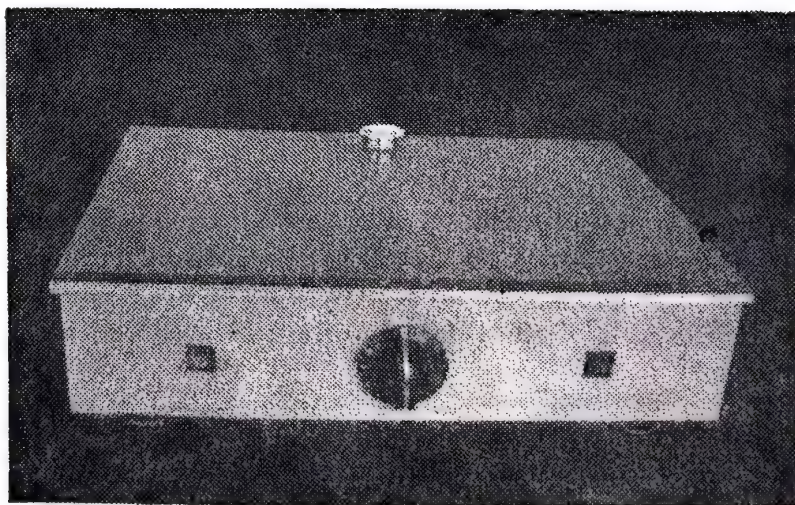


Fig. 119 — Platină șofantă electrică

parafină, timp de 5 minute. Secțiunile care nu sînt lipite vor prezenta la privirea dosului lamei o „oglină” în dreptul secțiunii.

Secțiunile din anumite țesuturi (mușchi, țesuturi elastice) precum și cele fixate în acid osmic și bicromați se lipesc cu mare greutate și pentru acest motiv se poate recurge la așa-numita celoidinare. În acest scop, secțiunile sînt culese pe lame foarte curate, după care se scurge excesul de apă și se sugativează atent. Se așază apoi peste secțiuni o bucătică de hîrtie de filtru uscată și se picură peste ea alcool absolut, repetîndu-se operațiunea după 1—2 minute. Lamele vor fi trecute în soluție de celoidină 1% unde se țin 5 minute și în continuare, în alcool 70° timp de 10 minute, astfel încît pelicula de celoidină să se întărească. Deparafinarea și colorarea ulterioară nu sînt împiedicate de stratul de celoidină. Metoda este indicată mai ales pentru colorarea PAS, colorarea Gram pe secțiuni, cînd folosirea albuminei este contraindicată.

Colorarea

Pentru a se putea diferenția diversele țesuturi și celule între ele în cursul examinării la microscop, este necesară colorarea lor. Chiar țesuturile pigmentate (piele, iris, coroidă), pentru a permite observarea unor detalii de structură, necesită colorări suplimentare. Materia colorantă este fixată în mod variabil de diferite tipuri de țesuturi, conform afinităților lor tinctoriale. Prin compoziția chimică foarte complexă a țesuturilor și prin caracterul diferit al coloranților, se produce o repartiție diferențiată a colorantului și se obțin nuanțe diferite, chiar dacă se folosește un singur colorant. Coloranții acizi produc de obicei colorația prin imibiție, în timp ce cei bazici prin precipitare — aceasta din urmă fiind un fenomen de suprafață propriu numai anumitor țesuturi (de exemplu colorația nucleară a granulațiilor bazofile, colorația mucusului, a cartilajului). Dar pe lîngă aceste procese fizice se produc și reacții chimice care stau la baza fixării coloranților în țesuturi. Uneori însă, substanța colorantă nu se prinde de elementele structurale ale țesuturilor decît dacă se intervine cu substanțe care facilitează acest lucru. Aceste substanțe sînt cunoscute sub numele de mordanți, iar operațiunea — mordansare. Între țesut, mordant și colorant se produce o combinație stabilă. Dintre mordanți pot fi menționați — oxidanții metalici (acidul osmic, cromic, azotic, fosfomolibdenic, fosfotungstic), oxidanți metaloizi (iodul, bromul), oxidanți organici (acidul picric, fenolul), alauni (feric, potasic) unele baze (soda caustică, carbonatul de potasiu, carbonatul amoniacal). După cum se vede, o parte din aceste substanțe sînt folosite și ca fixatori, ceea ce face ca, prin fixare chiar, să se facă o mordansare.

În acest context mai trebuie menționat un fenomen întîlnit în procesul de colorație și anume — metacromazia. Aceasta este proprietatea pe care o au unele substanțe de a colora în mod diferit față de culoarea lor aparentă. Pe baza acestei însușiri, cu unul și același colorant se pot colora în mod diferit elemente tisulare sau celulare diferite. Dintre coloranții metacromatici pot fi amintiți — tionina, albastru de toluidină, azurul de metilen, violetul de metil etc.

După însușirile lor chimice, coloranții pot fi: acizi, bazici și neutri.

De obicei substanțele colorante sînt săruri în care baza sau acidul determină culoarea. În cazul coloranților bazici, baza este colorată, iar acidul este incolor (de exemplu albastrul de metilen este o sare formată din tetrametilitionină colorată și acid clorhidric incolor). În cazul coloranților acizi, baza este incoloră iar acidul colorat (de exemplu eozina este compusă din acid carmic colorat și sodiu incolor). În coloranții neutri, atât baza cît și acidul sînt colorați. Există și coloranți care nu au nici baze nici acizi în structură și ca urmare, nu pot forma săruri (coloranți indiferenți). Ei sînt solubili în alcool, oleuri grase, și colorează de obicei materiile grase (de exemplu Sudanul — un colorant natural).

După modul de obținere, coloranții mai pot fi: naturali (carminul, hematoxilina, orceina, safranul etc.) și artificiali (verdele de metil, albastrul de toluidină, eozina, fucsina, verdele luminos etc.).

După afinitățile tinctoriale coloranții pot fi nucleari (de obicei bazici — carminul, hematoxilina, verdele de metil, albastrul de toluidină, albastrul de metilen, tionina), coloranți citoplasmatici (de obicei acizi — orceina, safranul, eozina, fucsina, verdele luminos) și coloranți indiferenți (Sudanul).

Colorarea se poate face în mod diferit după țesutul în cauză și după colorant. În principiu, aceasta poate fi vitală și pe elemente fixate. Cea mai larg folosită este colorația pe elemente fixate. După modul cum se acționează cu colorantul, în practică sînt folosite mai multe procedee:

- colorația directă (prin acțiunea directă a colorantului asupra țesutului);

- colorația indirectă (care necesită folosirea unor mordanți);

- colorația simplă (nucleară sau citoplasmatică, utilizîndu-se un singur colorant);

- colorația complexă — prin acțiunea mai multor coloranți: aceasta poate fi simultană sau succesivă, după cum se acționează cu complexul colorant;

- colorația progresivă, care folosește coloranți slabi, diluați, care acționează timp îndelungat, colorînd țesuturile treptat;

- colorația regresivă — în care se face supracolorarea țesuturilor, urmată de îndepărtarea excesului de colorant, cu ajutorul unei substanțe diferențiatore;

- colorația panoptică, proprie coloranților neutri și metacromatici, prin care se poate pune în evidență un număr mare de elemente, cu tonuri variate.

Colorația pe elemente fixate diferă după metoda de obținere a secțiunilor.

În cazul pieselor secționate prin congelare, secțiunile pot fi colorate imediat sau după o prealabilă fixare pe lamă. Colorarea secțiunilor nefixate se face prin trecerea lor prin băi succesive de coloranți, puși în sticle de ceasornic. Manipularea pieselor se face cu ace de disociație, avîndu-se grijă de a nu le rupe, îndoii sau dezintegra. Spre exemplificare sînt date cîteva din cele mai frecvente metode folosite.

Colorația simplă cu eozină

Secțiunile se trec rapid prin colorant (cîteva secunde) după care se spală într-o baie de apă distilată, se culeg pe o lamă de microscop, se montează și se examinează.

Colorația simplă cu hematoxilină

Secțiunile se trec rapid în soluția de colorant, după care urmează o baie de apă de robinet (10 minute) în care culoarea secțiunilor vi-rează spre albastru, apoi o baie scurtă de apă distilată, montare și exa-minare.

Colorarea bicromică cu hematoxilină-eozină

- colorare cu hematoxilină — rapid, cîteva secunde, pînă la ob-ținerea culorii violet a secțiunii
- baie de apă de robinet — 10 minute
- apă distilată — spălare
- colorarea cu eozină 1% — cîteva secunde
- spălare cu apă distilată
- montare, examinare.

Dacă secțiunile sînt lipite pe lamă, se folosesc vase speciale — pahare Borel prin care lamele se trec succesiv — conform metodei de colorare preconizată, după aceleași tehnici, doar că timpul de ținare în baia de colorant se prelungește la 1—2 minute în cazul hematoxilinei.

În cazul pieselor secționare la parafină este necesară mai întîi deparafinarea lor pentru ca coloranții să poată fi fixați.

Deparafinarea se obține cu ajutorul solvenților parafinei (benzenul, toluenul, xilolul), secțiunile trecîndu-se în stare lipită pe lamă, prin 2—3 băi cu asemenea solvenți, repartizați fie în pahare Borel, fie în băi speciale cu renuri multiple (băi Laveran), cînd e vorba de mai multe lame care se prelucrează simultan.

Deparafinarea durează 10—15 minute (cîte 5 minute în fiecare baie) și este urmată de hidratarea secțiunilor.

Hidratarea constă în trecerea lamelor cu secțiuni succesiv prin băi de alcool de concentrații descrescînde: alcool absolut — 1 baie, alcool



Fig. 120 — Baterie de colorare a secțiunilor histopatologice

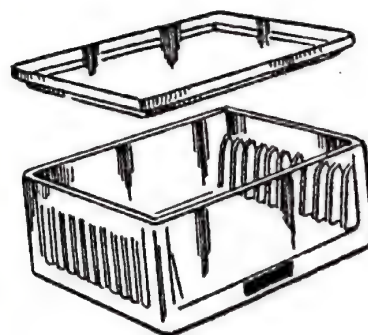


Fig. 121 — Baie Laveran pentru colorare

96° I, II, III (3 băi) și alcool 70° — 1 baie, după care urmează o baie de apă distilată și, în fine, băile de coloranți.

Colorarea constă în introducerea pieselor într-una sau mai multe băi de coloranți și menținerea lor un timp diferit, variabil după puterea de difuziune a colorantului în țesutul de cercetat. Colorația poate fi precedată de băi de mordanți. De asemenea ea este întreruptă sau urmată de diverse băi de diferențiere, apă de spălare etc. Pentru exemplificare sînt redată cîteva metode dintre cele mai uzuale.

Colorarea simplă cu eozină

- deparafinare
- hidratare — prin băi de alcool de concentrație descrescîndă (alcool absolut, alcool 96° I, II, III, alcool 70°) cîte 1 minut în fiecare
- spălare cu apă distilată
- colorare cu soluție apoasă de eozină 1% timp de 1—2 minute
- spălare cu apă distilată
- deshidratare — prin băi de alcool de concentrație crescîndă (alcool 70°, alcool 96° I, II, alcool absolut) cîte 1 minut în fiecare
- clarificare cu xilol
- montare în balsam de Canada.

Citoplasma și țesutul conjunctiv apar colorate în roșu.

Colorarea simplă cu hematoxilină

- deparafinare
- hidratare
- colorare cu soluție de hematoxilină Mayer, 4—6 minute
- apă de robinet timp de 10 minute (nucleii se colorează în albastru-închis, citoplasma și celelalte țesuturi apar cenușii)
- spălare cu apă distilată
- deshidratare
- clarificare cu xilol
- montare în balsam de Canada.

Asemănătoare este și colorația cu hematoxilina ferică (Heidenhein), în care mordansarea se face cu alaun de fier în soluție separată (durează însă mai mult).

Colorarea bicromică cu hematoxilină-eozină

Este o colorație combinată succesivă.

- deparafinare
- hidratare
- colorare nucleară timp de 4—6 minute cu hematoxilină Mayer
- spălare cu apă de robinet timp de 1 minut
- diferențierea cu apă acidulată (0,5% HCl) timp de 3 secunde
- spălare cu apă de canal 10 minute
- spălare cu apă distilată
- colorarea citoplasmatică și a țesutului conjunctiv timp de 1—2 minute cu soluție apoasă de eozină 1%
- spălare cu apă distilată
- deshidratare (alcool 70°, alcool 96° I, II, alcool absolut)
- clarificare cu xilol
- montare în balsam de Canada.

Nucleii vor apărea colorați în violet intens, citoplasma în roșu, țesutul conjunctiv în roșu intens, globulele roșii în galben-roșiatic.

Colorația tricromică — hematoxină-eozină-verde luminos

- deparafinare
- hidratare
- spălare cu apă distilată
- hematoxină, 6—8 minute
- apă de robinet, la care se adaugă câteva picături de acid acetic glacial 10 minute
- colorare cu eozină (sol. apoasă 1%) sau eritrozină oranj, timp de 5—8 minute
- apă distilată — spălare
- acid fosfomolibdenic timp de 5—8 minute
- colorare cu sol. apoasă verde luminos 1%, timp de 1 min.
- apă distilată — spălare 2—3 minute
- alcool 70° — pînă se elimină excesul de colorant
- alcool 96° I, II, alcool absolut, cîte 1 minut
- xilol
- montare

După aceleași principii se poate efectua și colorarea tricromică hematoxină-eozină-albastru de metil.

Colorația cu Sudan III

- colorare cu soluție Sudan 0,1% — 24 de ore
- spălare cu apă distilată
- colorare cu hematoxină, 1—2 minute
- apă de robinet — 10 minute
- spălare cu apă distilată
- montare în glicerină, examinare.

Nucleii apar colorați în violet, substanța grasă în galben portocaliu.

Colorația Gram-dublu se folosește pentru punerea în evidență a germenilor în secțiuni. Constă în următoarele:

- colorare cu violet de gențiana 1 minut
- tratare cu soluție Lugol 1 minut
- diferențiere cu alcool-acetonă
- recolorare cu fucsină diluată 1/10 timp de 1 minut
- spălare cu apă distilată
- deshidratare, montare

Colorația Ziehl-Neelsen se folosește pentru punerea în evidență a acido-rezistenților în țesuturi:

- colorare cu fucsină Ziehl — 24 de ore
- spălare cu apă
- diferențiere cu alcool-acid (100 ml alcool de 70° + 3 ml HCl concentrat) pînă cînd nu se mai scurge alcool colorat din secțiune
- spălare în apă de robinet curgător timp de 10 minute
- recolorare cu albastru de metilen 0,1% timp de 15 minute
- spălare cu apă
- deshidratare, montare

Colorația Romanowsky-Giemsa se folosește pentru punerea în evidență a corpusculilor elementari în secțiunile tisulare. Constă în următoarele:

- secțiunile deparafinate se țin 10 minute în apă distilată, după care se introduc într-o baie Laveran cu soluție colorantă Giemsa, diluată

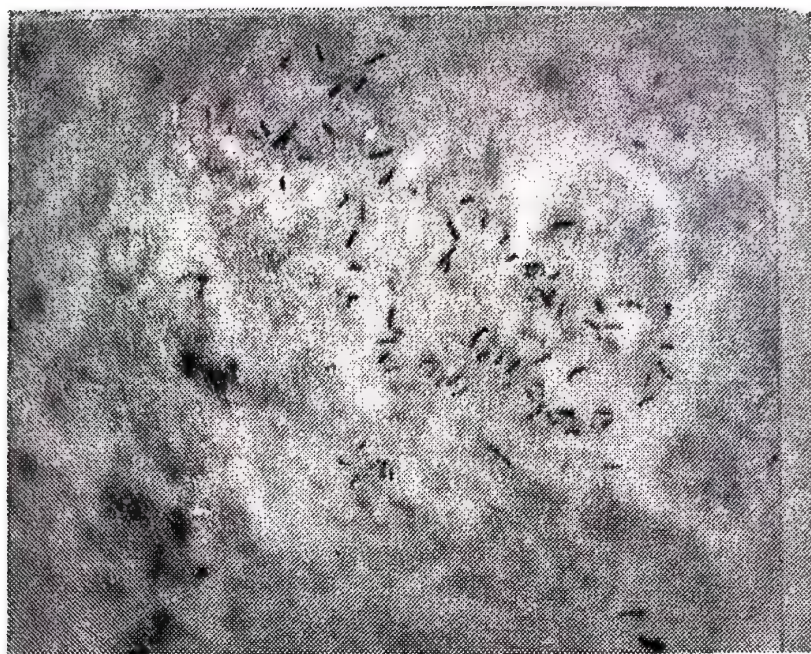


Fig. 122 — Bacili ai tuberculozei în secțiuni de țesuturi

ex tempore în proporție de 1 ml soluție de bază la 15 ml, și se mențin 24—48 de ore, la întuneric; se recomandă ca la 12 ore soluția colorantă să fie schimbată;

- spălare cu apă distilată — 15 minute
- deshidratare în alcool absolut
- diferențierea se face picurînd atent pe suprafața secțiunii o soluție preparată din esență de cuișoare (10 ml) în alcool absolut (90 ml); în momentul în care colorarea secțiunii, inițial albastră, începe să vireze spre roz, se spală abundant cu alcool absolut;
- clarificare cu xilol sau toluol
- montare în balsam de Canada.

Dacă se dorește o colorare mai rapidă se poate recurge la introducerea băii Laveran cu colorant la 45°C timp de 12 ore, perioadă în care colorantul se înprospătează de 2—3 ori.

Corpusculii elementari vor apărea colorați în roz-aprins sau purpuriu pe un fond roz-mov iar nucleii în violet deschis.

Colorația Nicolau-Kopciowska servește evidențierii corpusculilor elementari și face uz de două soluții colorante:

- Soluția A :

— fucsină acidă	1,5 g
— alcool metilic	33,0 ml
— glicerină	5,0 ml
— sol. de acid oxalic 6%	2,0 ml
— apă distilată	60,0 ml
- Soluția B :

— albastru de metil	1,5 g
— alcool metilic	33,0 ml
— glicerină	5,0 ml
— sol. de acid oxalic 6%	2,0 ml
— apă distilată	60,0 ml

Colorația se realizează după cum urmează:

- secțiunea deparafinată și hidratată se acoperă cu soluția A timp de 1—2 ore
- se varsă colorantul și fără a se spăla, se acoperă cu soluția B, timp de 10—15 minute
- se spală abundant cu alcool absolut
- clarificare cu xilol sau toluol
- montare în balsam de Canada.

Corpusculii elementari apar colorați în nuanțe variind de la albastru-deschis la violet, pe un fond albastru-deschis. Corpusculii elementari degenerați, surprinși în faza incluziogenetică, vor apărea în nuanțe roșietice. Incluziile celulare se colorează în roșu-închis.

Montarea

După colorare secțiunile pentru a putea fi examinate la microscop, trebuie montate. Montarea se poate face în:

- medii apoase
- medii anhidre

Montarea în medii apoase se face punând deasupra secțiunii colorate scoase din apă, o picătură de glicerină iar apoi o lamelă perfect curată. Se presează ușor cu un ac de disociat, pentru eliminarea bulelor de gaze. Cantitatea de glicerină nu trebuie să fie prea mare, pentru a nu depăși, prin compresarea lamelei, marginile acesteia. Preparatele astfel confecționate se pun în poziție orizontală, iar păstrarea se face pe suporturi speciale în aceeași poziție. Metoda se folosește în special pentru preparatele provizorii, întrucât nu asigură o conservabilitate de durată a piesei. Dacă preparatele trebuie păstrate totuși câteva zile, se poate recurge la chituirea lor (fixarea lamelei de lamă și închiderea spațiului în care este inclusă secțiunea). Chituirea se poate face în mai multe feluri:

- cu parafină sau ceară: acestea se topesc în vase mici și se aplică cu ajutorul unei spatule pe limitele dintre lamă și lamelă;
- cu chit special destinat acestui scop și care se prepară din:

— lanolină anhidră	20,0 g
— colofoniu	80,0 g

care se amestecă la cald și se păstrează în cutii de metal sau carton. Chituirea propriu-zisă în acest caz se realizează cu ajutorul unei vergele de metal de 1,5—2 mm diametru îndoită în unghi drept la una din extremități. Cu vergeaua încălzită la flacără se ia o cantitate redusă de chit și se aplică în mai multe puncte pentru fixarea lamelei. Ulterior prin aplicarea ei de-a lungul lamelei, se realizează întinderea uniformă a chitului. Prin răcire, spațiul dintre lamă și lamelă se închide complet.

Procedul se aplică larg și pentru preparatele de insecte, viermi etc.

Montarea în medii anhidre servește la pregătirea preparatelor care urmează a fi păstrate vreme îndelungată. Aceste medii anhidre sînt reprezentate de diverse rășini cu indice de refracție mare, solubilizate în toluol sau xilen și care, prin evaporare, se întăresc lipind lamela de pre-

parat. Cea mai răspîndită metodă este montarea în balsam de Canada, dar se pot folosi și alte rășini de conifere sau rășini sintetice cu calități optice asemănătoare. Aceste rășini nefiind miscibile cu apa, o condiție esențială este ca secțiunile să fie foarte bine deshidratate înainte de montare.

Deshidratarea care urmează colorării se face în băi succesive de alcool cu concentrații crescînde. Din ultima baie de colorant secțiunile libere sau lipite pe lamă se trec într-o baie de spălare a excesului de colorant, după care urmează băile de alcool pînă la alcool absolut. Se fac de obicei cîte două băi de fiecare concentrație, în care secțiunile stau cîte 2—3 minute. O ședere mai îndelungată se soldează cu decolorarea treptată a secțiunilor.

Clarificarea urmează deshidratării și se face cu scopul de a îndepărta alcoolul, precum și ultimele resturi de apă.

După băile de alcool, secțiunile se introduc în 1—2 băi de clarifiant, care poate fi toluolul fenicat (trei părți toluol și o parte fenol), alcoolul amilic sau benzolul. Cel mai bun este alcoolul amilic. Apoi se fac 1—2 băi de toluol sau xilol pur.

Montarea propriu-zisă. În cazul secțiunilor libere (obținute la gheață sau celoidină) ele se pun pe lamă și se întind. Cele lipite pe lamă se șterg de toluol și, înainte ca ele să se usuce, se acoperă cu o picătură de balsam, peste care se pune o lamelă. Se presează lamela cu vîrfurile unuia ac de disociere, eliminîndu-se eventualele bule de aer. Mărimea picăturii de balsam trebuie să fie astfel aleasă încît prin întinderea ei să nu treacă peste marginile lamelei. Trebuie subliniat că pe parcursul tuturor timpilor de prelucrare (deparafinare, hidratare, colorare, deshidratare) secțiunile nu trebuie să se usuce. În primele 24 de ore lama se păstrează în poziție orizontală, dar apoi se poate așeza în orice poziție, balsamul fiind consolidat și deci lamela fixată.

Impregnările metalice

Constituie o altă modalitate de a diferenția elementele diferitelor țesuturi. Se bazează pe proprietatea pe care o au unele elemente de a reține sărurile metalice și, pe de altă parte, pe afinitatea specifică pe care o au aceste săruri pentru unele structuri (celule sau fibre). Reducerea sărurilor respective la nivelul țesuturilor face ca ele să fie depuse sub forma unor precipitate fine. Astfel de săruri sînt azotatul de argint, protargolul, clorura de aur, clorura de platină, azotatul de cobalt. Reducerea se face prin acțiunea însăși a țesutului pregătit prin fixare, prin intermediul unor agenți fizici (lumina, căldura) sau agenți chimici (formol, hidrochinonă, acidul formic).

Metodele de impregnare se folosesc pentru punerea în evidență a celor mai fine structuri celulare, precum și a elementelor sistemului nervos. Printre metodele de impregnare cele care folosesc azotatul de argint par a fi cele mai răspîndite (metoda Bielschowsky, Kolatshev).

În aplicarea impregnărilor metalice, pentru reușita lor, sînt necesare cîteva condiții:

— să se folosească numai reactivi chimici puri

- să se lucreze cu apă bidistilată neutră
- sticlăria să fie de cea mai bună calitate și să fie folosită numai în acest scop

- să se folosească cantități suficiente de soluții (cel puțin de 20 de ori volumul pieselor)

- în cursul impregnării, preparatele să fie ținute la adăpost de lumină (în vase colorate în brun)

- să se evite folosirea instrumentelor metalice (ele vor fi din sticlă sau material plastic).

Impregnările metalice se pot face pe țesuturi membraniforme (mezenter sau alte endotelii), pe secțiuni sau în piese masive (blocuri).

Impregnarea țesuturilor membraniforme

- fixarea țesutului pe o suprafață întinsă (cu ace de arici)
- spălare cu apă distilată
- impregnarea prin scufundare într-o soluție de NO_3Ag 1/200 timp de 1—2 ore

- reducerea prin expunere la lumina solară, pînă ce țesutul devine de culoare brună (2—5 minute)

- spălare cu apă distilată

- întărirea țesutului cu alcool 90°

- ajustarea țesutului la dimensiunile corespunzătoare în vederea montării

- deshidratare

- montare în balsam sub lamelă.

Prin această tehnică, limitele celulare vor apărea foarte bine evidențiate, de culoare brună-închisă.

Impregnarea secțiunilor se poate realiza prin metoda Bielschowsky, care constă în următoarele:

- fixare timp de 3—6 săptămîni în formol 10%

- spălare cu apă de robinet timp de 24 ore

- spălare cu apă distilată — 24 de ore

- secționarea prin congelare — la 5—10 microni

- mordansarea timp de 24 de ore cu AgNO_3 2% la întuneric

- spălare cu apă distilată

- impregnare cu lichid Bielschowsky timp de 15—20 minute pînă secțiunile devin brun-închise (azotat de argint amoniacal preparat astfel: se adaugă la 10 ml AgNO_3 10% 5 picături de NaOH 40%; precipitatul brun-verzui care rezultă, se dizolvă cu amoniac adăugat picătură cu picătură, fără a depăși limita solubilizării, după care se completează pînă la 20 ml cu apă distilată)

- spălare cu apă distilată

- reducere cu formol 1/9, timp de 10 minute

- spălare, deshidratare, montare.

În acest caz, fibrele nervoase (axonii) apar de culoare brună-închisă, pe un fond gălbui.

Se poate folosi în același scop și colorația Gömöri.

Colorația Gömöri (impregnația argentică). Secțiunile deparafinate și hidratate, se trec succesiv prin următoarele soluții:

- permanganat de potasiu 1% — 2 minute

- spălare cu apă timp de 5 minute

- metabisulfid de potasiu 1—3% timp de 1 minut

- spălare în apă — 5—10 minute
- sulfat dublu de fier și amoniu 2% (se prepară extemporaneu), timp de 1 minut
- spălare în apă 3—5 minute
- spălare în 2 băi de apă distilată câte 2 minute
- impregnare în soluție de azotat de argint amoniacal, timp de 1 minut sau mai mult (prin tatonare)
- spălare rapidă în apă distilată (5—10 secunde)
- reducere în formol neutru 1/10 în apă distilată, timp de 5 minute
- spălare cu apă, 5 minute
- soluție de clorură de aur 0,1—0,2% timp de 10 minute
- spălare în apă distilată
- reducere în metabisulfat de potasiu 1—3% timp de 1 minut
- tiosulfat de sodiu 1% — 1 minut
- spălare în apă curentă 15—20 minute
- deshidratare în băi de alcool de concentrații crescînde (70°, 80°, 96°, alcool absolut)
- clarificarea în xilol
- montare în balsam de Canada.

Rezultat: fibrele colagene se colorează în roșu-purpuriu, fibrele de reticulină în negru intens, nucleii în negru iar citoplasma în galben cenușiu.

Reușita colorației depinde în foarte mare măsură de prepararea soluției argento-amoniaceale (amoniacul în exces duce la o insuficientă impregnare, în timp ce reducerea cantității de amoniac se soldează cu supraimpregnări grosiere), precum și de timpul de spălare ce succede impregnarea (o spălare insuficientă determină formarea de precipitate, iar o spălare prelungită are ca efect o impregnare inegală a fibrelor de reticulină).

Impregnarea blocurilor se poate face folosind metoda Kolatshev:

- fixarea piesei în amestecul:

— acid cromic 1%	7,0 ml
— bicromat de potasiu 3%	7,0 ml
— acid osmic 2%	4,0 ml

timp de 24 ore la rece

- spălare rapidă cu apă distilată
- impregnare cu acid osmic 1% timp de 3—9 zile la 35°C
- spălare cu apă curentă — timp de 24 ore
- deshidratare
- incluzia la parafină
- secționare
- deparafinare, deshidratare, montare

Metoda este folosită pentru lucrări de citologie fină, prin ea punîndu-se în evidență aparatul Golgi (acesta apare de culoare brună).

Metode de diagnostic histopatologic rapid

În unele cazuri se impune precizarea diagnosticului într-un timp cât mai scurt, pentru a putea fi instituite măsurile corespunzătoare atît în privința individului în cauză, cît și a contacților. Astfel, de exemplu.

În caz de turbare este necesar să se cunoască în cât mai scurt timp dacă animalul în cauză a fost sau nu turbat. În medicina umană și mai rar în medicina veterinară, în caz de operații, este necesar să se cunoască natura țesuturilor cu aspect tumoral, care adesea apar ca surprize, ce incumbă cu totul altă conduită. Pentru a avea deci un rezultat cât mai rapid s-au căutat metode care să dureze câteva ore cel mult și, bineînțeles, să fie cât mai simple și expeditiv.

În cazul turbării, spre exemplu s-a recurs la punerea în evidență a corpusculilor Babeș—Negri în amprente practicate din sistemul nervos (cornul lui Ammon, hipocamp, cerebel). Aceste amprente se colorează apoi după diferite metode:

Metoda Sellers folosește o soluție compusă din două părți:

- soluția A: albastru de metilen 2% în metanol
- soluția B: fucsină bazică 4% în metanol. Ele se amestecă ex tempore în proporție de 15 ml soluție A la 2—4 ml soluție B, la care se adaugă 25 ml metanol. De menționat că nu este necesar ca amprente să se fixeze înainte de colorare, ele pretindându-se la aceasta chiar în stare încă umedă. Colorantul este lăsat să acționeze 4—5 secunde. Se spală cu apă de robinet și se usucă. Citoplasma neuronilor apare albastruie, nucleii și nucleolii — albaştri, hematiile — roșii-cărămizii, bacteriile — albastre-închis. Corpusculii Babeș—Negri apar roșii-purpurii, ușor de identificat.

Se poate recurge și la secțiuni obținute prin fixare rapidă. În acest scop se folosesc fixatorii anhidri (alcoolul, acetona, amestecul de acetona și alcool, amestecul de acetona și cloroform) sau fixatorii obișnuiți (formolul) încălziți pînă aproape de punctul de fierbere. Pentru creier, cea mai indicată este acetona. Piese nu mai groase de 4 mm recoltate din segmentele de predilecție se pun în 50—100 ml acetona, preferabil încălzită în prealabil la 50°C în etuvă. În 5—10 minute piesele se întăresc ușor, și se efectuează ajustarea lor pînă la grosimea de 2—3 mm. După alte 10—15 minute ele devin albe-cretacee, dense, dar nesfărîmicioase.

După fixare, piesele se trec într-o baie de parafină unde se țin 30—60 minute, în funcție de grosimea piesei. Se consideră că piesa este pătrunsă de parafină cînd nu se mai degajă bule de acetona la încălzirea parafinei cu o spatulă încălzită.

După incluzie piesele se secționează și se întind pe lame, se deparafinează, se colorează prin una din metodele electivă (Mans, Lenz, Carpano, Gallego, Sellers etc.), se montează și se examinează.

Spre exemplificare sînt redată cîteva procedee mai mult folosite:

- fixarea cu acetona la 56° timp de 90 minute
- trecerea în baia de parafină încălzită
- incluzia în parafină
- secționare
- colorarea cu eozină soluție apoasă 1% timp de 1 minut
- spălare în apă distilată
- colorare cu albastru de metilen Löffler timp de 1 minut
- deshidratare
- montare.

Metoda Lenz

- fixare în acetona iodată, timp de 1 oră la 56°

- alcool 96° — 30 minute
- xilol — 30 minute
- baie de parafină încălzită
- incluzia în parafină
- colorare cu eozină 1 minut
- spălare cu apă
- colorare cu albastru de metilen Löffler — 1 minut
- spălare
- diferențiere cu alcool alcalin (alcool alcalinizat cu NaOH)
- diferențiere cu alcool acid (alcool acidulat cu acid acetic)
- spălare în alcool absolut
- xilol
- montare.

Secțiunile la gheață, pe țesuturi fixate, pot fi prelucrate rapid după următoarea tehnică:

- se recoltează porțiuni foarte mici (de 3/3 mm) din țesutul de cercetat
- se fixează timp de 5 minute în soluție de formol 1/4 încălzită până aproape de fierbere (70—80°), respectiv până la o ușoară degajare de gaz
- congelare și secționare la microtomul de gheață, la 10—15 microni
- culegerea secțiunilor în apă distilată
- întinderea secțiunilor (alcool de 70°, urmat de apă distilată)
- lipire pe lamă
- colorare
- montare.

Colorarea acestor secțiuni se poate face prin următoarele metode:

Colorația cu albastru de toluidină

- alcool 90° 1—2 secunde
- alcool absolut 1—2 secunde
- xilol, cca 2 secunde, timp în care lamele se agită pentru clarificare
- alcool absolut 1—2 secunde
- alcool 90° 1—2 secunde
- se așază apoi lamele pe stativ și se acoperă cu soluție 1% albastru de toluidină, lăsând în contact 30—60 secunde
- clătire rapidă în apă, sugativare
- lamele se umezesc cu alcool 90° și se sugativează bine
- se umezesc apoi cu alcool absolut și se sugativează
- se trec în xilol pentru clarificare și se sugativează (operațiunea se poate repeta de mai multe ori pentru a se obține o clarificare corespunzătoare)
- montare în balsam

Colorarea durează 3—4 minute.

Colorarea rapidă cu hematoxilină-eozină

- alcool 90° 1—2 secunde
- alcool absolut 1—2 secunde
- xilol cca 2 secunde pentru clarificare
- alcool absolut 1—2 secunde
- alcool 90° 1—2 secunde

- hematoxină 2 minute
- clătire în apă de robinet
- alcool acidulat 1%
- spălare în apă de robinet în amestec cu câteva picături de soluție apoasă saturată de carbonat de litiu — cca 30 secunde (până secțiunile devin albastre)
- eozină 1% 10—15 secunde
- umezire cu alcool 90° și sugativare (dacă secțiunile sînt lipite pe lame)
- umezire cu alcool absolut și sugativare
- xilol
- montare în balsam.

Colorarea durează cca 5 minute.

Un examen cu durată scurtă se folosește și pentru depistarea siderocitelor și a stazei capilare din jurul venei centro-lobulare, prezente în cazul anemiei infecțioase a calului. În acest scop piesele recoltate prin biopsie hepatică se prelucreză prin fixare rapidă și apoi prin incluzie în parafină. Secționarea, colorarea și montarea permit evidențierea acestor modificări cu o ridicată valoare diagnostică.

Metode curente de diagnostic hematologic

Sîngele și aparatul hematopoetic participă activ la procesele metabolice permanente ale organismului, asigurînd, pe lîngă schimburile gazoase și de substanțe dintre acestea și mediu, și o constantă adaptare la diferitele condiții nou apărute. Sîngele asigură, prin circulația sa în patul vascular, corelația dintre diferite organe și funcții, el fiind în același timp mediul în care se desfășoară o serie de procese metabolice.

În cursul diferitelor procese patologice sîngele suferă și el o serie de modificări față de valorile considerate normale speciei, modificări care pot constitui indicii importante pentru diagnostic, prognostic și tratament. Astfel de exemplu, în anemia infecțioasă a calului se constată pe lîngă scăderea substanțială a numărului de hematii și apariția formelor tinere; în leucozele mamiferelor pot apărea o serie de modificări ale seriei leucocitare care furnizează date prețioase pentru diagnostic. Există apoi anemiile oligocitemice aplastice de natură alimentară, ca și o gamă întreagă de modificări ale formulei leucocitare (eozinofilia din dermatita eozinofilică, limfocitoza din bolile infecțioase cronice, bazofilia din unele forme de leucoză etc.), care pot fi stabilite cu precizie printr-un examen hematologic corespunzător.

Examenul hematologic constă în efectuarea unor determinări cantitative și calitative, dintre care le redăm pe cele mai importante.

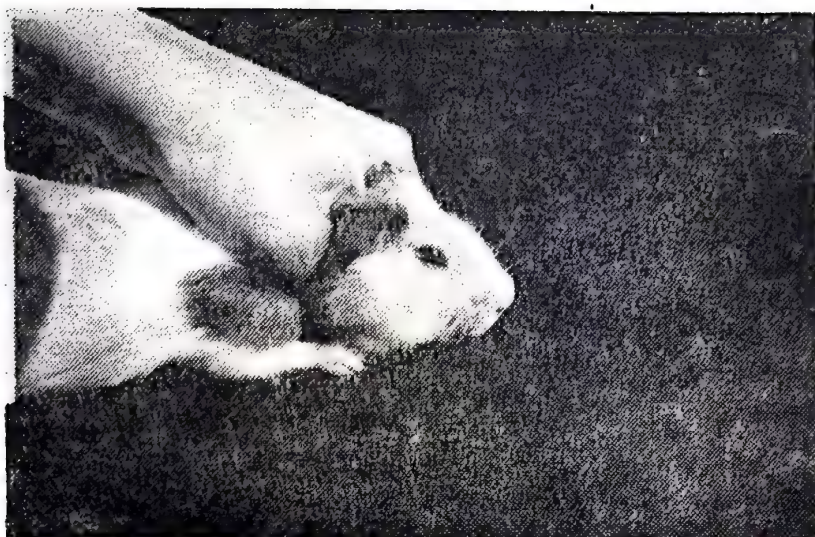
1 – Numărarea globulelor roșii

În principiu, se realizează prin numărarea directă, la microscop, a celulelor conținute într-un volum constant de lichid, diluat într-o porție cunoscută. Diluarea este necesară, pe de o parte pentru a se evita coagularea, iar pe de altă parte, pentru că globulele roșii, fiind foarte numeroase, nu s-ar putea număra nediluate.

În vederea numărătorii sînt necesare următoarele:

- Ace pentru puncție, alcool, vată, eter
- Lichid de diluție; cel mai frecvent folosit, pentru mamifere, este lichidul Hayem (NaCl 1 g, sulfat de sodiu 5 g, sublimat 0,5 g, apă distilată 200 ml). Înainte de utilizare soluția trebuie filtrată prin hirtie de filtru. Ea nu trebuie să fie mai veche de 3 săptămîni.

- Pipetă Potain pentru globule roșii — compusă dintr-un tub capilar gradat și o bulă de diluție cu o perlă mobilă în interior; tubul ca-



a



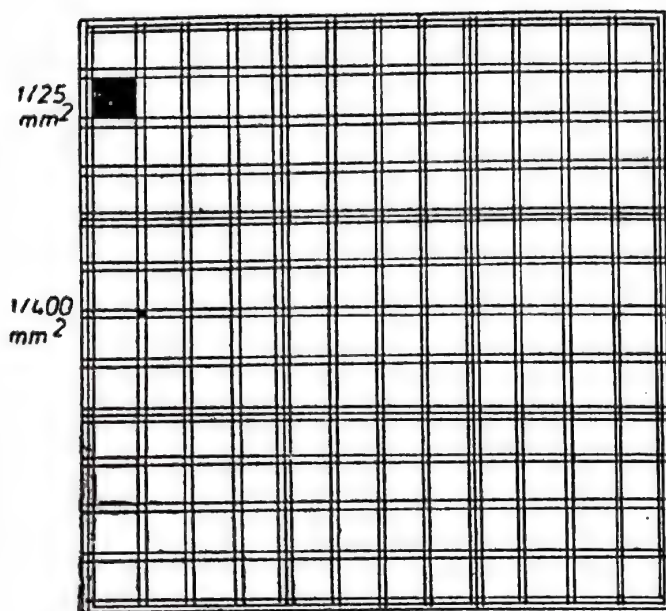
b

Fig. 123 — Recoltarea singelui din sinusul venos la cobai
a — conținția ; b — recoltare propriu-zisă

pilar este împărțit în 10 gradații, la mijloc există gradația 0,5, la baza bulei gradația 1, iar deasupra bulei gradația 101. Dacă singele este aspirat pînă la gradația 0,5, iar restul pînă la 101 se completează cu lichid diluant, se obține diluția 1/200; dacă se aspiră sînge pînă la gradația 1, iar restul diluant, se obține diluția 1/100. În cazul în care numărătoarea va fi făcută din sînge recoltat pe anticoagulant, este necesar ca înainte de aspirarea în pipetă Potain să se încline flaconul de cca 30 ori, pentru a realiza o cit mai bună omogenizare; agitarea se va face încet pentru a evita producerea hemolizei.

— Camerele de numărare sînt dispozitive din sticlă care au gravate suprafețe exact determinate, vizibile la microscop și care delimitează cîmpurile pe care se efectuează numărătoarea. După modul cum sînt gravate aceste suprafețe, există mai multe tipuri de camere:

a) Camera Thoma — delimitează o suprafață de 1 mm² care este împărțită în 400 pătrățele, suprafața unui pătrățel fiind de 1/400 mm².



Sanț de umplere

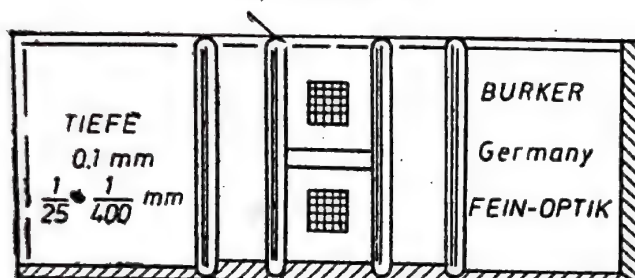


Fig. 124 — Camera Bürker

Pe suprafața de 1 mm^2 sînt delimitate 16 pătrățele mari prin linii triple.

b) Camera Bürker — are o suprafață de 9 mm^2 împărțită în 9 pătrate a 1 mm^2 , delimitate prin linii triple. Fiecare milimetru pătrat este subîmpărțit prin linii duble în 16 pătrate. La întretăierea liniilor duble se înscriu pătrate mici, care reprezintă $1/400$ dintr-un milimetru pătrat.

c) Camera Bürker-Türk are o suprafață de 9 mm^2 , împărțită în 9 pătrățele a 1 mm^2 prin linii triple. Pătratul din mijloc de 1 mm^2 este de tipul Thoma, fiind împărțit în 400 pătrățele mici a $1/400$, care folosește la numărarea eritrocitelor, iar pătrățele din colțuri, împărțite la rînul lor în cîte 16 pătrățele mici, servesc la numărarea elementelor albe.

d) Camera Goreaev — are un cadrilaj în care alter-

nează pătrățelele mici de $1/400$ dintr-un milimetru pătrat pentru eritrocite, în grupuri de cîte 16, cu pătrate pentru leucocite.

— Microscopul. Se lucrează cu obiectiv 40 și ocular 10 sau 7.

Tehnica de numărare. Se face puncția unei regiuni periferice (ureche, buză) și după eliminarea primei picături de sînge se aspiră cu pipeta pînă la diviziunea 0,5 sau 1, în funcție de diluția dorită ($1/200$ sau $1/100$). Dacă sîngele depășește ușor diviziunea, prin atingerea vîrfului pipetei cu hîrtie de filtru sau vată, se aduce coloana exact pînă la gradatie. Se aspiră apoi lichidul de diluție pînă la diviziunea 101, se așază pipeta în poziție orizontală, se astupă cele două capete cu degetul mare și cel mijlociu și se agită pentru omogenizare 2—3 minute, apoi se aplică lamela pe camera de numărat și după scurgerea primelor picături din pipetă, pe hîrtie de filtru, se apropie vîrful pipetei de marginea camerei acoperită cu lamela și se lasă să intre prin capilaritate în cameră o cantitate de sînge diluat, încît spațiul dintre lamă și lamelă să fie umplut în întregime, fără ca lichidul să treacă în șanțurile laterale și fără ca lamela să se deplaseze sau să intre bule de gaz. În caz contrar, operațiunea se repetă după ștergerea camerei. Se așteaptă cîteva minute pentru sedimentarea elementelor pe cadrilaj și se pune camera la microscop, efectuîndu-se numărarea. Se vor număra 5 pătrate mijlocii, care conțin cîte 16 pătrățele mici de $1/400 \text{ mm}^2$ deci în total 80 pătrățele mici.

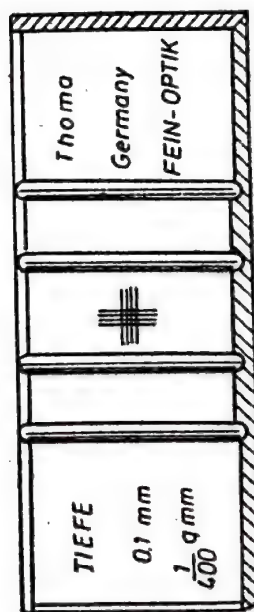
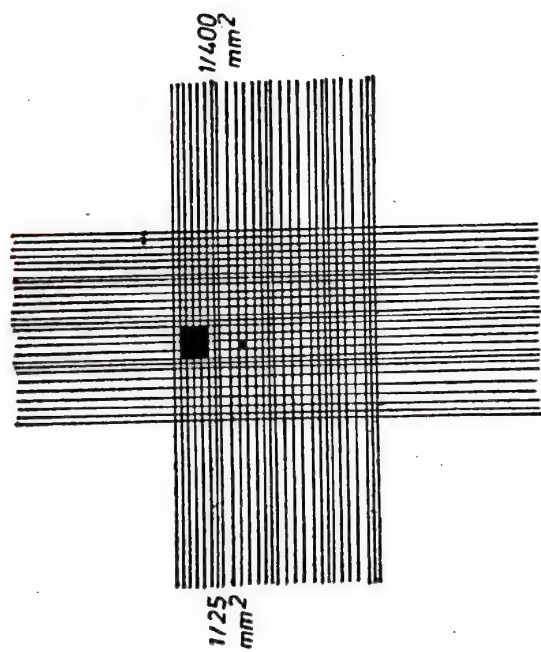


Fig. 125 — Camera Thoma

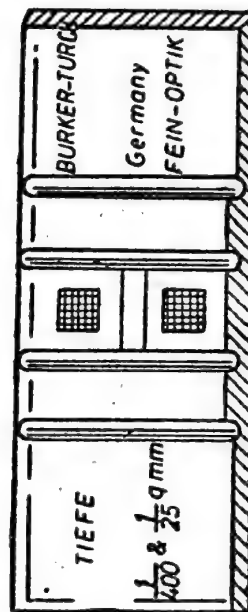
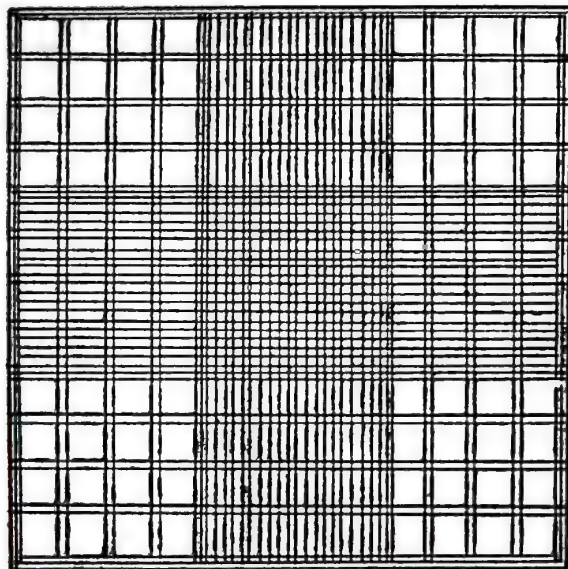


Fig. 126 — Camera Bürker-Türk

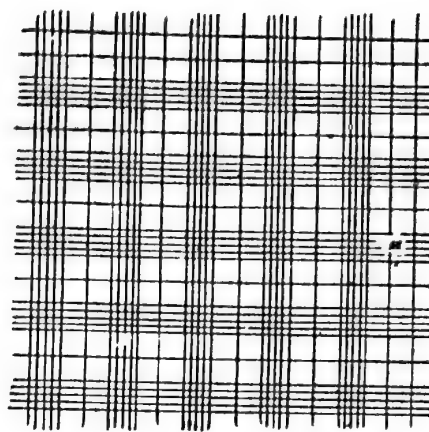


Fig. 127 — Camera Goreaev

Pentru a nu se număra același element de două ori, în cazul celor aflate pe linie, se vor număra întotdeauna cele aflate pe două laturi, de exemplu sus și stînga. Pentru a afla numărul total de hematii pe milimetru cub se va înmulți numărul hematiilor numărate cu 10 000 în cazul că diluția a fost de 1/200 și cu 5 000 dacă diluția a fost 1/100.

La păsări, pentru numărarea globulelor roșii se întrebuintează aceleași pipete Potain și camere de numărat, dar lichidul de diluție diferă de cel utilizat pentru mamifere, și anume:

Lichidul Wiesman — se compune din:

— Fucsină	50 mg
— Formalină neutră	5 ml
— Soluție Ringer	95 ml

Tehnica de lucru este identică cu cea de la mamifere, eritrocitele apărînd nucleate și colorate în trandafiriu.

O altă metodă (metoda Cosma) utilizează ca lichid diluant următoarea soluție de bază:

— Clorură de sodiu	1,0 g
— Biclorură de mercur	0,8 g
— Citrat de sodiu	0,3 g
— Oxalat de amoniu	0,1 g
— Apă distilată ad	100,0 ml

Se prepară apoi cu ajutorul acestei soluții de bază, o soluție de eozină 1% și o soluție de albastru de tripan 1%.

Soluția diluantă de lucru va fi obținută din:

— Soluție de eozină 1%	8,0 ml
— Soluție de albastru de tripan	4,0 ml
— Soluție de bază	100,0 ml

Tehnica de lucru este aceeași ca la mamifere, cu mențiunea că citirea trebuie să se facă după 20—30 minute din momentul diluării singelui cu acest lichid. Metoda are avantajul că permite atât numărarea eritrocitelor cît și a leucocitelor și trombocitelor.

Erorile care pot surveni în cursul numărării globulelor roșii se pot datora unei spălări defectuoase, coagulării singelui înainte de diluare, sedimentării globulelor în pipetă înainte de introducerea în camera de numărat sau numărării defectuoase a pătrățelelor.

Pentru a evita asemenea erori, ca și din rațiuni privitoare la mîna de lucru, de timp și expeditivizarea testărilor la ora actuală se tinde spre folosirea din ce în ce mai largă a metodelor de determinare automată. Ea se bazează pe folosirea unor aparate electronice de tipul Celscopului (AB Lars Ljungberg and Co, Stockholm), Erymat-ului sau a celui de tip Coulter Counter, acesta din urmă permițînd efectuarea unui mare număr de teste (numărători de globule roșii și albe, PCV, Hb, VEM, HEM, CHEM) dintr-un volum foarte mic de sînge (1 ml) într-un timp extrem de scurt — 20 de secunde.

2 — Numărarea elementelor albe

Valoarea clinică a numărului de leucocite este superioară numărării globulelor roșii prin semnificația pe care o are în stabilirea diagnosticului diferitelor boli. Ea constituie ca urmare un test indispensabil pentru orice investigație hematologică.

Se procedează în principiu de aceeași manieră ca și în cazul elementelor roșii; în acest scop se folosesc însă pipete Potain special destinate numărării leucocitelor și un lichid diluant care conservă numai elementele nucleate, hematiile fiind lizate (lichidul Türck, format din acid acetic 1 ml, apă distilată 100 ml și albastru de metilen 1% câteva picături). Pipeta pentru diluție are un tub capilar cu 10 gradații, două notații: 0,5 și 1, urmate de o bulă de diluare și, în fine, notația 11. Diluția singelui recoltat pînă la gradația 0,5 este de $1/20$ iar a celui recoltat pînă la gradația 1 de $1/10$.

Tehnica de numărare. Se recoltează sîngele prin puncția unei regiuni periferice, se diluează cu lichid Türck în pipeta Potain și, după omogenizare, se pune în camera de numărat. Se vor număra cîteva (4—5) cîmpuri de cîte 1 mm^2 (în întregime) și se face media leucocitelor numărate pe un cîmp. Această medie se înmulțește cu diluția ($1/10$ sau $1/20$) și cu înălțimea camerei ($1/10$), practic cu 200 sau cu 100, după cum în pipetă s-a aspirat sînge pînă la diviziunea 0,5 sau 1.

Trebuie menționat însă că prin această metodă sînt numărate toate elementele nucleate, deci și eritroblaștii, care sînt hematii neajunse la maturație. De aceea pentru a face o apreciere reală a numărului de globule albe, din cifra totală obținută se va scădea un procent egal cu cel al eritroblaștilor obținuți la formula leucocitară. De exemplu, dacă la

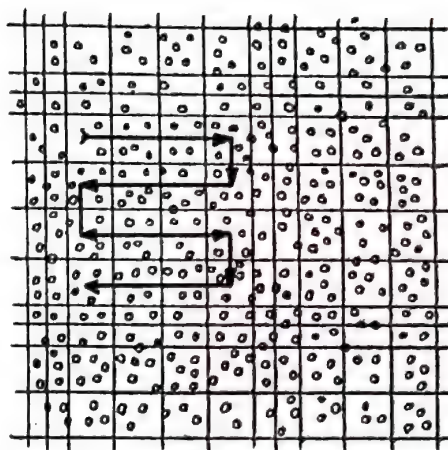


Fig. 128 — Modul de numărare a elementelor albe

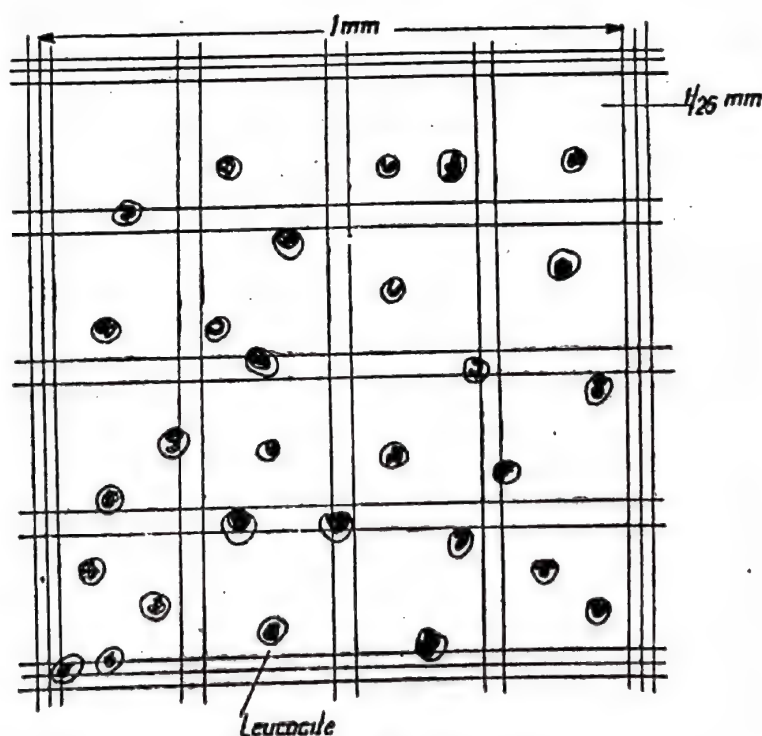


Fig. 129 — Numărarea elementelor albe

determinarea formulei leucocitare se obțin 10 eritroblaști la 100 elemente numărate, numărul de leucocite real va fi cu 10% mai mic decât cel obținut la numărătoarea elementelor albe.

În cazurile de leucocitoză se poate face o diluție mai mare a singelui (1 : 200) folosind o pipetă pentru eritrocite în care se aspiră sînge pînă la diviziunea 0,5 și lichid de diluție pînă la 101, factorul de corecție în acest caz fiind $10 \times 200 = 2000$. Spre exemplu, dacă cifra medie este de 50 leucocite/1 mm², rezultatul va fi: $50 \times 200 = 100\,000$ leucocite/mm³.

În leucopenii, se procedează dimpotrivă la micșorarea diluției, respectiv 1 : 10 în loc de 1 : 20, încît cifra medie obținută se va înmulți cu 100.

3 – Numărarea eozinofilelor

Folosește pentru diluare o soluție de acetonă-eozină (eozină soluție apoasă 2% — 5 ml, acetonă 5 ml și apă distilată 90 ml), pipeta pentru leucocite și camera Nageotte sau Bürker. Eozinofilele vor fi ușor colorate, în timp ce celelalte elemente vor fi lizate. Pe determinarea numărului de eozinofile se bazează testul Thorn, pentru decelarea integrității funcției corticosuprarenale. La indivizii normali, cu cortexul suprarenal intact, administrarea de ACTH atrage după sine scăderea eozinofilelor circulante.

4 – Numărarea trombocitelor

Numărarea trombocitelor constituie unul din testele principale utilizate în investigarea sindroamelor hemoragice. Ea întîmpină însă o serie de dificultăți datorate pe de o parte faptului că trombocitele aglutinează, se fragmentează și se dezintegrează rapid, iar din cauza dimensiunilor reduse sînt ușor confundate cu diferite impurități și artefacte, iar pe de altă parte, din cauza erorilor, uneori inerente, de tehnică.

La ora actuală se practică două tipuri de metode: indirecte și directe.

Metoda indirectă este metoda prin care se stabilește proporția trombocitelor la 1000 de eritrocite, prin examinarea unui frotiu colorat, după care se raportează la numărul de eritrocite cuprinse într-un mm³, calculîndu-se în final numărul de trombocite din 1 mm³ de sînge.

Tehnica de lucru. Se aplică o picătură de sulfat de magneziu 10% pe locul unde urmează să se facă punctia și prin aceasta se punționează pielea, amestecîndu-se cu colțul unei lamele sau cu o baghetă fină de sticlă, picătura de sînge rezultată cu sulfatul de magneziu (acesta are rolul de a împiedica aglutinarea spontană a trombocitelor), din amestecul rezultat făcîndu-se frotiuri. Acestea se usucă rapid la aer (eventual se poate fixa după uscare cu alcool metilic timp de 10 minute sau cu o soluție formată din sublimat corosiv 0,1 + acid acetic glacial 6 picături + alcool absolut 100 ml), după care se colorează cu soluție Giemsa dublu concentrată, timp de 30 minute, sau prin metoda May Grünwald Giemsa timp de 40—50 de minute. Se examinează la microscop, numărîndu-se trombocitele întîlnite la 1000 de eritrocite (pentru ușurarea numărătorii este bine să se folosească un ocular special — Ehrlich, care delimitează

cîmpul de numărare). Cunoșcînd numărul de eritrocite/mm³ și aplicînd regula de trei simplă, se calculează numărul de trombocite/mm³. De exemplu: la 1000 eritrocite s-au găsit pe frotiu 45 trombocite; numărul de globule roșii/mm³ fiind de 3 200 000 rezultă că:

$$\text{Nr. de trombocite/mm}^3 = \frac{3\,200\,000 \times 45}{1\,000} = 45 \times 3\,200 = 144\,000/\text{mm}^3$$

Metoda are dezavantajul că poate da rezultate eronate fie din cauza repartiției inegale a trombocitelor pe suprafața frotiului de sînge, fie a amestecului neomogen al sulfatului de magneziu cu picătura de sînge etc. Pentru aceste motive se optează pentru numărarea directă a trombocitelor cu ajutorul hemocitometrelor, fără a se renunța însă la examinarea acestor elemente pe frotiul de sînge, nu în scopul stabilirii numărului de trombocite ci pentru a surprinde eventuale modificări morfologice ale acestora, semnificative pentru unele stări patologice.

Metoda directă (van Herwerden) se execută după aceeași tehnică utilizată la numărarea globulelor roșii, cu diferența că lichidul de diluție are o altă compoziție și anume:

- Uree 0,70 g
- Apă distilată 7,0 ml
- Soluție de clorură de sodiu 9% 3,0 ml
- Albastru de crezil (urme)

Într-o pipetă Potain pentru globule roșii se face o diluție 1% (preferabil din sînge venos), se agită cîteva minute și se lasă apoi în repaos 30 minute pentru producerea hemolizei. Se agită din nou 1—3 minute, se aruncă primele picături din pipetă și apoi se încarcă camera de numărat. Se procedează la numărarea trombocitelor după același sistem ca la globulele roșii. Trombocitele apar ca mici discuri refringente, cu tentă albastră.

Un lichid de diluție îmbunătățit este cel recomandat de Popa, Enache și Nicolară; el asigură prin conținutul în oxalat de amoniu, un efect eritrocitolizant superior, pe de o parte, iar pe de altă parte, prin anticoagulantul utilizat — Na₂EDTA se asigură conservarea și împiedică aglutinarea trombocitelor.

Compoziția acestui lichid de diluție este următoarea:

- Na₂EDTA 0,01 g
- Oxalat de amoniu 1,0 g
- Apă distilată ad 100,0 ml

Durata de păstrare a diluantului este lungă și nu necesită condiții speciale de conservare.

Diluțiile pot fi făcute în pipete Potain pentru leucocite (1 : 20), fie în cele pentru eritrocite (1 : 100). După încărcare pipeta se agită 1—2 minute, se îndepărtează primele 3—4 picături și apoi se încarcă camera de numărat. Se lasă în repaus cca 15 minute pentru a se produce liza hematiilor și sedimentarea trombocitelor (camera se așază pe o hîrtie de filtru umedă într-o placă Petri și se acoperă, pentru ca în timpul necesar sedimentării să nu se producă evaporarea lichidului). Se examinează la microscop cu obiectiv 10, ocular 10, în lumină obișnuită sau cu condensatorul coborît. Pe fondul cenușiu creat, trombocitele apar ca mici sfere strălucitoare, mobile.

Erorile care pot apărea în cursul numărării trombocitelor se pot datora mai multor cauze: amestec neomogen al singelui cu diluantul, erori de numărare, erori ale pipetei, erori de diluție, erori de recoltare, distrugerea unei părți din trombocitele care vin în contact cu suprafețele de sticlă, erori datorate contaminării lichidului de diluție, a pipetei sau camerei de numărare, cu impurități. Pentru a se evita această ultimă posibilitate de eroare, este bine să se facă o numărătoare „la alb”, numai cu lichid de diluție, fără sînge. Prezența a peste 5000 corpusculi/mm³ impune centrifugarea și filtrarea lichidului de diluție și curățirea pipetei și a camerei de numărare cu alcool. De asemenea, pentru a se evita distrugerea trombocitelor este bine să se folosească sticlă siliconată. Numărătorea directă a trombocitelor trebuie însoțită de controlul acestora pe un frotiu colorat, iar rezultatele obținute trebuie coroborate cu alte teste ale hemostazei: timpul de sîngerare, retracția cheagului etc.

5 – Numărarea reticulocitelor

Determinarea numărului de reticulocite (eritrocite imature, cu citoplasmă oxifilă) reprezintă un test specific foarte important pentru cunoașterea mecanismului de producere și pentru urmărirea tratamentului diferitelor tipuri de anemii, dînd indicații prețioase referitoare la capacitatea de regenerare a măduvei osoase.

În vederea efectuării acestui test, se pregătește o capsulă parafinată în care se pun 25 cm³ soluție alcoolică sau salină 1‰ albastru de crezyl brillant + 25 cm³ soluție de citrat de sodiu 3,8‰.

Soluția salină de albastru de crezyl brillant se obține din:

- albastru crezyl brillant 1,0 g
- ser fiziologic 9‰ 100,0 ml

Soluția alcoolică conține:

- albastru crezyl brillant 0,4 g
- alcool etilic 95% 100,0 ml

Ambele soluții trebuie filtrate înainte de utilizare.

În capsula astfel pregătită se introduc 3—5 picături de sînge, se amestecă prin agitare temeinică și se pune totul într-o cameră umedă unde se lasă 30 de minute în repaus. După acest interval de timp se agită din nou pentru a realiza o cît mai bună omogenizare și se extrage cu ajutorul unei baghete parafinate o picătură din amestec, se depune pe o lamă, efectuîndu-se un frotiu obișnuit. Frotiul se usucă prin agitare la aer, se fixează timp de 2 minute cu alcool metilic și se colorează 15 minute cu soluție Giemsa, preparată ex tempore din 15 picături sol. Giemsa-mamă + 10 ml apă distilată neutră. Se lasă să se usuce la aer și se examinează cu un obiectiv de imersie, folosind același ocular Ehrlich ca și pentru trombocite, determinînd numărul de reticulocite la 1 000 de hematii normale. Tehnica de numărare și modul de calcul sînt identice cu cele pentru trombocite.

Reticulocitele au dimensiuni asemănătoare macrocitelor; în urma colorației cu albastru de crezyl brillant, în citoplasmă se evidențiază substanța reticulo-filamentoasă sub forma unor granule de dimensiuni diferite, de culoare albastră, răspîndite pe toată suprafața celulară, alcătuiind

adesea o rețea arborescentă. Integritatea acestei rețele și prezența granațiilor mari, denotă vîrsta tină a celulelor, caractere ce diminuează pe măsura maturării elementelor roșii.

În măduva hematogenă, reticulocitele se găsesc în număr mare în timp ce prezența lor în sîngele periferic normal este sporadică, fiind variabilă cu specia și vîrsta animalelor.

Reticulocitoza poate fi constatată în unele forme de anemii cum sînt cele posthemoragice, anemiile hemolitice cronice, în intoxicații cu plumb, arsenic, precum și după transfuziile de sînge, sau după splenectomii. În schimb, în anemiile aplastice numărul reticulocitelor este foarte redus sau nul.

6 – Dozarea hemoglobinei

În principiu, constă în obținerea unei soluții de clorhidrat de hematină din sîngele de cercetat, care se compară colorimetric cu un etalon stabilit pentru cantitatea normală de hemoglobină de 16 g/100 ml sînge.

Pentru determinare sînt necesare:

- hemoglobinometru Sahli
- o pipetă capilară cu o capacitate de 20 mm³
- o pipetă Pasteur
- o baghetă de sticlă pentru omogenizare
- acid clorhidric n/10.

Tehnica de lucru. Se pune în tubul gradat al hemoglobinometrului acid clorhidric n/10 pînă la diviziunea 10. Se recoltează sîngele pînă la diviziunea unică a pipetei, avîndu-se grija de a șterge vîrful acesteia de urmele de sînge din exterior. Se introduce vîrful pipetei la fundul tubului gradat, conținînd acid clorhidric în cantitate de cîteva picături sau pînă la cea mai inferioară diviziune a eprubetei și se suflă tot sîngele, spălîndu-se pipeta de cîteva ori prin aspirări și refulări succesive. Se scoate pipeta și se agită tubul pentru a omogeniza amestecul, se așteaptă 5 minute, timp în care se formează clorhidratul de hematină, care imprimă amestecului o culoare brună-închisă. Prin diluare cu apă distilată adăugată cu picătura, se aduce culoarea amestecului la cea a etalonului cu care se compară. Cînd nuanța lichidului este identică cu aceea a etalonului, se citește gradația de pe tub la nivelul meniscului inferior al lichidului. Rezultatele se pot exprima în grame de hemoglobină la 100 ml sînge.

În dozarea hemoglobinei pot surveni erori legate de nerespectarea întocmai a tehnicii (folosirea unor pipete știrbite, neomogenizarea temeinică a sîngelui cu acidul clorhidric, începerea diluării înainte de a se fi scurs cele 5 minute etc.). Citirea trebuie efectuată numai la lumina zilei.

Se pot folosi și metode fotometrice, care dau rezultate mai exacte.

Cantitatea de hemoglobină este scăzută față de normal în anemiile de orice natură. În anemiile cronice (anemia infecțioasă), pe lîngă numărul scăzut de globule roșii/mm³, intervine faptul că acestea fiind aruncate în patul vascular de către organele hematopoetice în stare insuficient maturată, nu sînt încărcate cu cantitatea normală de hemoglobină.

7 – Determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH)

Hematiile din singele recoltat pe un anticoagulant sedimentează sub influența forței de gravitație, după un timp variabil cu starea fiziologică a individului, cu starea proteinelor plasmatice. Determinarea VSH se poate face prin metode diferite (Westergreen și Nevodov sînt cele mai larg răspîndite).

Materialele necesare pentru metoda Westergreen:

- seringă și ac pentru puncție venoasă
- eprubete
- pipete Westergreen — divizate de la 0 la 200
- stativ pentru fixarea pipetelor
- citrat de sodiu 3,8% (citrat trisodic)

Tehica de lucru. Într-o seringă de 10 ml se aspiră 2 ml citrat de sodiu 3,8%, se face puncția venoasă, și se aspiră în seringă sînge pînă la diviziunea care marchează 10 ml. Se face apoi omogenizarea temeinică a conținutului seringii, prin înclinări repetate, după care sîngele se trece într-o eprubetă obișnuită. Se ia apoi o pipetă Westergreen și se aspiră pînă la diviziunea zero, aflată la partea superioară a pipetei. Trebuie menționat că toate aceste operațiuni se vor efectua cît mai repede, pentru ca hematiile să nu sedimenteze. Se aplică vârful pipetei pe dopul de cauciuc al stativului, iar capătul superior se fixează în dispozitivul cu arc al acestuia. Se notează exact ora cînd s-a fixat pipeta și se face citirea la 15, 30, 60, 120 minute și la 24 de ore, notîndu-se numărul de diviziuni la fiecare citire. Trebuie avut în vedere că folosirea altor anticoagulanți modifică VSH (de exemplu oxalatul o mărește), păstrarea singelui micșorează VSH (de aceea se recomandă efectuarea imediată), iar poziția înclinată o mărește (există și metode care folosesc poziția înclinată — metoda Fuente—Hito).

Factorii care influențează VSH sînt de natură eritrocitară și plasmatică; cei mai importanți sînt cei plasmatici (fibrinogenul și globulinele) care determină o anumită încărcătură electrică a hematiilor, capabilă să mențină hematiile în suspensie o perioadă mai îndelungată, prin respingerea reciprocă ce există. VSH crește în special în bolile infecțioase cronice (anemie infecțioasă) în boli infecțioase septicemice, în hemopatii (leucoze, reticuloze, mieloame). Valori scăzute ale VSH se întîlnesc în unele stări alergice.

8 – Determinarea hematocritului (PCV)

Hematocritul reprezintă raportul procentual dintre masa eritrocitară și volumul sanguin, fiind unul dintre cele mai precise examene pentru determinarea stărilor de anemie și policitemie, cu condiția respectării stricte a tehnicii de lucru. Hematocritul este totodată una din valorile necesare în determinarea unor constante eritrocitare (VEM, CHEM).

Pentru evaluarea hematocritului, singele făcut incoagulabil, se centrifughează cu scopul de a separa hematiile de plasmă. Se poate uza în acest scop de una din cele două metode existente: macrometoda și micrometoda (microhematocritul).

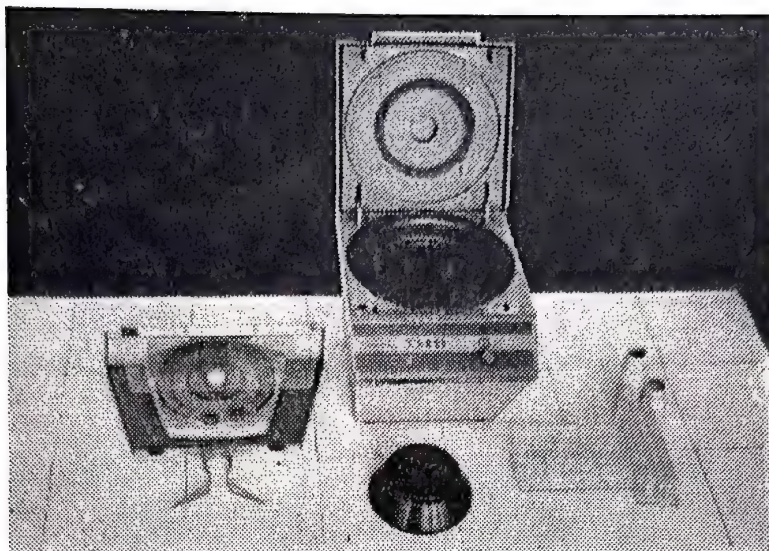


Fig. 130 — Centrifugă specială pentru hematocrit tip TH 11 — Janetzki

Macrometoda (Wintrobe)

Materiale necesare:

- instrumente pentru recoltarea sîngelui
- tub de centrifugă gradat — 10 diviziuni (se poate confecționa din pipete Westergreen). Tuburile trebuie să fie din sticlă mai groasă pentru a rezista la centrifugare;
- anticoagulant sub formă de pulbere, pentru a nu modifica volumul plasmatic sau eritocitar. Pentru macrometodă, cel mai indicat este amestecul de oxalați, folosit în proporție de 2 mg amestec pulbere pentru 1 ml sînge (cel de 2 mg rezultă din uscarea a 0,1 ml din soluția de oxalați 2%). Se mai poate folosi și EDTA. Heparina este folosită mai mult pentru micrometodă;
- balanță pentru echilibrarea tuburilor de centrifugă
- centrifugă.

Tehnica de lucru. Se recoltează sînge venos, avînd grijă ca acul și seringă să fie perfect uscate pentru a nu se produce hemoliză și se depune imediat în flaconul în care, în prealabil, s-a pus cantitatea de anticoagulant corespunzătoare cantității de sînge recoltată. Se omogenizează proba prin răsturnări lente (nu prin învîrtire sau clătire), după care se trece la repartizarea sîngelui în tuburile de centrifugă. Umplerea tuburilor se face cu ajutorul unei pipete Pasteur foarte bine efilată, pentru a putea ajunge în fundul tubului, de unde începe umplerea acestuia. Cantitatea de sînge aspirată în pipeta Pasteur trebuie să fie suficientă pentru a permite umplerea dintr-odată a tubului (respectiv pînă la diviziunea 10). Pe măsură ce se umple tubul pipeta se extrage progresiv, avînd grijă ca vârful ei să fie permanent sub nivelul sîngelui și să nu se formeze bule de aer). Dacă sîngele introdus în tub depășește diviziunea 10, excesul se va îndepărta cu ajutorul unei hîrtii de filtru. După terminarea operațiunii de umplere, tuburile se pun la centrifugă, introducîndu-se sub fiecare și un mic tampon de vată cu scopul de a le proteja de spargere. Centrifugarea se face strict 30 de minute la 3000 rotații/minut. Dacă se folosesc centrifuge unghiulare, este necesar ca după scoaterea tuburilor din centrifugă, acestea să fie lăsate un timp în poziție

verticală pentru ca nivelul superior al eritrocitelor să revină din poziția oblică (rezultată în urma centrifugării) la cea orizontală. Se face apoi citirea direct, dacă tubul este gradat, sau se măsoară cu ajutorul unei rigle sau al unei hirtii milimetrice, înălțimea coloanei de hematii (h) și înălțimea totală a coloanei de sînge (H). Calculul se face astfel:

$$h\% = \frac{100 \times h}{H}$$

De exemplu, dacă H este egal cu 50 diviziuni și h măsoară 20 diviziuni — hematocritul este de:

$$\frac{100 \times 20}{50} = 40\%$$

Deci din volumul total de sînge 40% sînt hematiile iar 60% plasmă. Se are însă în vedere că, chiar dacă centrifugarea este completă, hematiile neadaptîndu-se perfect unele peste altele, între ele rămîne un spațiu cu plasmă interstițială. Ea este socotită ca fiind în general de 5% din volumul eritrocitar total. Mai există, de asemenea, și stratul leucocitar-trombocitar. El este însă în mod normal neglijat, fiind mai mic de 1%; în leucocitozele puternice (leucoze) acest strat crește considerabil și trebuie măsurat pentru a aprecia corect atît stratul eritrocitar cît și cel plasmatic.

Există unele diferențe între sîngele venos, cel arterial și cel capilar. Hematocritul arterial și mai ales cel capilar sînt mai scăzute.

Un hematocrit ridicat se constată în plasmoragii, pleură sanguină. Un hematocrit scăzut se întîlnește în hidremie, anemii.

Constante și indici eritrocitari. Dimensiunile, forma și încărcarea cu hemoglobină a eritrocitelor se pot determina prin diferite metode de calcul matematice (metoda Wintrobe), rezultatele putînd fi exprimate prin cifre absolute (constante) sau relative față de normal (indici) sau cu ajutorul unei rigle de calcul speciale.

Dintre constantele eritrocitare, pentru practica largă se recomandă determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM), hemoglobinei eritrocitare medii (HEM) și a concentrației eritrocitare medii în hemoglobină (CHEM).

Pentru determinarea acestora trebuie cunoscute:

- numărul de eritrocite/mm³, în milioane (E=10⁶/mm³)
- hemoglobina în grame/100 ml sînge (Hb)
- hematocritul % (Ht)

Pentru determinări se folosește sînge venos recoltat pe anticoagulant pulbere (EDTA, amestec de oxalați, heparină).

9 – Determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM)

Această constantă se calculează după formula:

$$VEM = \frac{Ht \times 10}{E}$$

Rezultatele se exprimă în microni cubi/eritrocit. Metoda are dezavantajul că în formula sa de calcul trebuie utilizat numărul de eritrocite, în stabilirea căruia apar o serie de erori inerente.

În anemia hipocromă severă, apar microcite, deci VEM este scăzut, în timp ce în anemia pernicioasă spre exemplu, eritrocitele sînt macrocitate, valoarea VEM fiind deci crescută.

10 – Determinarea hemoglobinei eritrocitare medii (HEM)

respectiv a conținutului mediu în hemoglobină al eritrocitelor, se calculează pe baza următoarei formule:

$$HEM = \frac{Hb \times 10}{E}$$

Rezultatele se exprimă în micromicrograme/eritrocit. Această metodă de determinare prezintă același dezavantaj ca și VEM, respectiv utilizarea în calcul a numărului de eritrocite.

Valorile crescute ale HEM se datoresc unui VEM mai mare față de normal, în timp ce valorile sale mai mici se pot datora, fie unui VEM scăzut, fie conținutului scăzut în hemoglobină a microcitelor. În general modificările HEM merg în paralel cu cele ale VEM.

11 – Determinarea concentrației în hemoglobina eritocitară medie (CHEM)

CHEM exprimă proporția din volumul eritrocitelor ocupată de hemoglobină. Formula sa de calcul este următoarea:

$$CHEM = \frac{Hb \times 100}{Ht}$$

Practic, este vorba de raportul greutate/volum (grame hemoglobină/unități hematocrit). Mai precis însă, CHEM reprezintă concentrația medie de hemoglobină pe unitatea de volum (100 ml) de masă eritocitară, încît rezultatele nu se exprimă în procente ci în grame/100 ml masă eritocitară (g/100 ml).

CHEM are o semnificație clinică mai importantă, întrucît exprimă capacitatea funcțională a eritrocitelor, pe baza concentrației în hemoglobină a acestora.

Este bine ca întotdeauna rezultatele furnizate de calculul acestor constante eritrocitare să fie confruntate cu examenul eritrocitelor pe frotiul de singe colorat.

Cu ajutorul constantelor eritrocitare prezentate se poate preciza tipul morfologic (normocitare, macrocitare, microcitare) și cromatic (normocrom și hipocrom) al unei anemii, elemente prețioase pentru indicațiile terapeutice.

12 – Determinarea timpului de sîngerare

Locul de elecție obișnuit pentru această probă este conchia auriculară (uneori și mucoasa buzei inferioare sau pielea de pe abdomen).

Puncționarea se face de preferință cu o lanțetă Francke (sau un alt instrument tăios) reglată pentru o profunzime constantă de 3 mm pentru

animalele mari, 1 mm sau sub 1 mm pentru cele mici. Se sugativează din 30 în 30 secunde sîngele care iese prin locul de puncție, pînă cînd sîngerarea încetează (pe sugativă nu mai apare nici o pată de sînge). Se împarte numărul petelor de pe sugativă la 2, rezultînd timpul de sîngerare în minute.

Dat fiind faptul că timpul de sîngerare determinat prin această metodă este influențat de o serie de factori (starea peretelui vascular, factori intra- și extravasculari) s-a preconizat înlocuirea acesteia cu alte procedee de testare și anume „viteza de picurare” și „timpul de picurare”.

Astfel, la cabaline, se introduce în vena jugulară un ac nr. 14, după ce în prealabil s-a făcut staza cu ajutorul garoului, numărîndu-se picăturile pe unitatea de timp.

Prelungirea timpului de sîngerare, în condițiile unui timp de coagulare normal indică o trombocitopenie (se verifică și încărcarea și aspectul trombocitelor pe un frotiu de sînge colorat). O astfel de modificare apare în cursul unor boli infecțioase cu sindrom de leucopenie cu agranulocitoză sau trombastenii, în cursul septicemiilor, în intoxicațiile cu substanțe ce conțin în structura lor nucleul benzoic, în cursul autointoxicațiilor — azotemie.

13 – Determinarea timpului de coagulare

Timpul de coagulare poate fi determinat prin una din metodele descrise mai departe.

Metoda lamelor. Pe 3 lame bine degresate cu alcool-eter, se picură cîte o picătură de sînge. Se notează cu precizie momentul depunerii picăturilor pe lame, după care lamele se vor așeza sub un clopot de sticlă (sau în plăci Petri cu capac) pentru a se limita evaporarea. Se verifică la intervale de 30 secunde, consemnîndu-se începutul coagulării din momentul în care înclinînd lama, picătura de sînge nu se mai deformează.

Metoda eprubetelor. Se aleg două eprubete mici pentru hemoliză, de calibre egale, perfect curate și uscate (preferabil cu fund plat), în care se repartizează cantități egale de sînge (2—4 ml); se astupă eprubetele de reacție cu dopuri de vată și se țin în poziție verticală preferabil la temperatura de 37°C. Se înclină din minut în minut una din eprubete, pînă cînd nivelul superior al sîngelui nu se mai deformează. În continuare se procedează în același fel și cu cea de a doua eprubetă. Timpul de coagulare este dat de intervalul scurs din momentul recoltării (aspirării) sîngelui în seringă și pînă la apariția coagulării în cea de a doua eprubetă.

Întrucît aceste metode sînt departe de a oferi date exacte cu privire la coagulabilitatea sîngelui, se tinde ca acest factor să fie apreciat pe baza determinării unor timpi intermediari care intervin în procesul atît de complex al coagulării. Astfel sînt: timpul de protrombină (reprezintă timpul de coagulare al sîngelui oxalatat, recalcificat optimal și cu o concentrație optimă de trombochinază). În această situație, coagularea depinde numai de concentrația în protrombină (timpul de protrombină al sîngelui de cercetat raportat la timpul de protrombină al sîngelui normal reprezintă valoarea protrombinică).

Timpul de coagulare este mărit în unele boli infecțioase cum sînt jigodia, tuberculoza în fază avansată, gurmă, sau în cazuri de ascită, anemie, leucemie, stări hemolitice consecutive unor afecțiuni cardiace, hepatice, hipotiroidie, intoxicații cu trifoi, anemia infecțioasă a calului.

Reducerea timpului de coagulare se întîlnește în cazurile de carențe nutritive, enterite, bronșite cronice, pneumonie lobară, febră peteșială, mioglobinemie paralytică, tromboză, hemoglobinemii, în urma administrării unor substanțe medicamentoase: săruri de calciu, vitamina C ș.a.

Cu toate că și această metodă este influențată de o serie de factori, totuși prezintă un procent mult mai mare de siguranță comparativ cu metoda pe lamă.

14 – Examenul morfologic al singelui

Stabilirea unui diagnostic hematologic complet și corect necesită în mod obligatoriu și investigații privind morfologia elementelor figurate ale singelui pe frotiu, care trebuie să cuprindă următoarele aspecte:

- raportul procentual al diferitelor tipuri de leucocite (formula leucocitară)

- aprecierea dimensiunilor, formei și încărcării cu hemoglobină a eritrocitelor

- aprecierea numărului și morfologiei trombocitelor

- aprofundarea studiului celulelor anormale care apar eventual în frotiu, prin metode și tehnici de colorare specifice fiecărei serii celulare

- examenul frotiurilor de măduvă osoasă pentru precizarea aspectelor legate de maturația diverselor celule și de procesul de proliferare a acestora.

În cazurile în care efectuarea puncției medulare nu este posibilă din anumite motive iar examenul unui frotiu obișnuit de sînge nu oferă date suficiente pentru precizarea diagnosticului unor hemopatii, se poate recurge la metoda îmbogățirii frotiului de sînge în leucocite și trombocite, respectiv la leucocitoconcentrare.

Utilizarea concentratului leucocitar în studiile de morfologie a singelui are indicații deosebite în următoarele cazuri:

- în stările de leucopenie cînd datorită numărului redus de leucocite, unele tipuri de celule nu pot fi surprinse pe frotiul obișnuit;

- în determinarea intensității unor reacții citochimice la nivelul diferitelor elemente figurate ale singelui (fosfataza alcalină leucocitară, glucide, lipide ș.a.);

- în scopul evidențierii în frotiu a unor elemente celulare anormale (megakariocite, limfoblaști, leucoblaști, plasmocite, celule reticulare și reticuloendoteliale, celule tumorale) care scapă tehnicilor uzuale ale frotiului clasic.

Pentru numeroasele sale avantaje, la ora actuală se tinde ca această metodă să fie introdusă ca probă curentă de diagnostic hematologic.

Tehnica îmbogățirii frotiului în leucocite și trombocite

Reactivi:

- Na_2EDTA 5,0 g
- NaCl 9‰ 100,0 ml

Tehnica de lucru. Întru-un tub conținând 1 ml soluție Na_2EDTA 5% în ser fiziologic se pun 9 ml sînge venos, omogenizîndu-se prin răsturnarea tubului de cîteva ori. Se lasă apoi tubul în poziție verticală timp de 2—3 ore, la temperatura camerei, pentru sedimentarea eritrocitelor.

Plasma supernatantă se decantează cu o pipetă Pasteur și se trece într-o eprubetă de centrifugă. Se centrifughează timp de 10 minute la 2 000 ture/minut, după care se îndepărtează plasma, cu excepția unei foarte mici cantități, care se amestecă cu sedimentul celular rămas și din care se vor face frotiuri subțiri, care se usucă rapid prin agitare la aer.

Prin aceste manopere leucocitele și trombocitele rămîn intacte sub aspect morfologic și biochimic, cu excepția monocitelor care pot prezenta vacuole în citoplasmă și nucleu.

Efectuarea frotiurilor de sînge

Materiale necesare:

- lame foarte curate, degresate și perfect uscate
- lame șlefuite cu colțurile tăiate

Tehnica de lucru. După punctia efectuată conform tehnicilor expuse anterior, cu colțul lamei șlefuite se ia o picătură mică de sînge (cca 3 mm

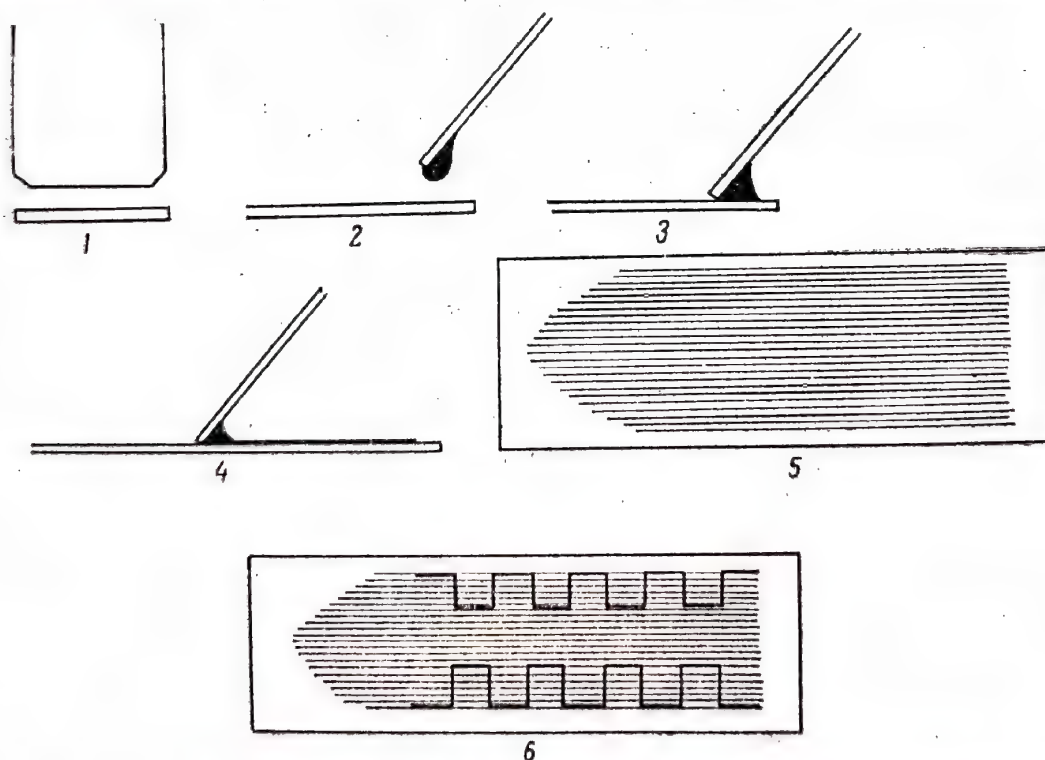


Fig. 131 — Modul de efectuare a frotiului de sînge și citirea în vederea stabilirii formulei leucocitare

1 — lama șlefuită; 2 — luarea picăturii pe lama șlefuită; 3 — întinderea picăturii pe marginea lamei șlefuite; 4 — etalarea pe lamă; 5 — aspectul frotiului corect; 6 — modul de citire a frotiului



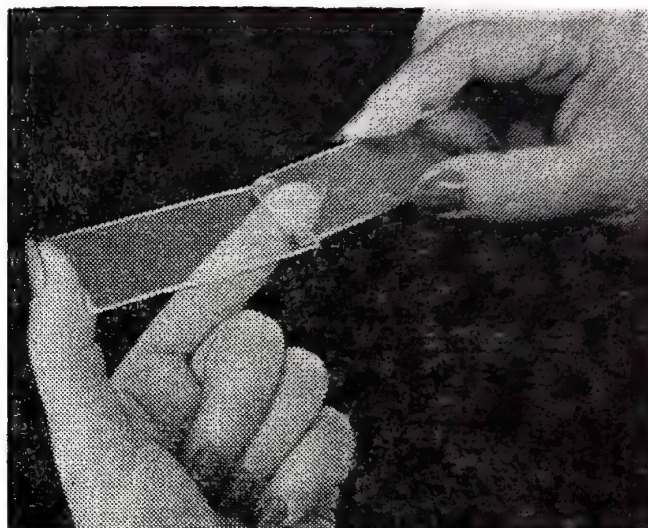
a



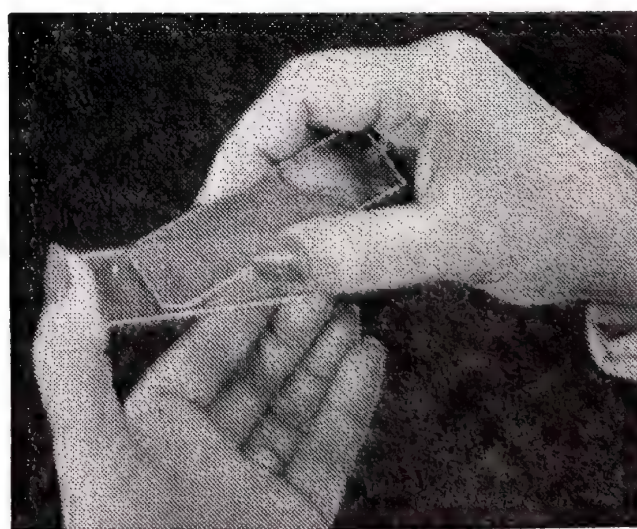
b



c



d



e

Fig. 132 — Efectuarea frotiului de sînge de la pasăre

a — dezinfecția crestei; *b* — secționarea unui lob al crestei; *c* — luarea unei picături de sînge; *d* — întinderea picăturii pe toată lățimea lamei șlefuite prin ușoare mișcări de lateralitate; *e* — efectuarea frotiului propriu-zis prin deplasarea în lungul axului longitudinal a lamei șlefuite înclinată

diametru), se aplică rapid pe o lamă degresată care se ține în poziție fixă între degetul mare și arătător (laturile mici ale lamei). După executarea citorva mișcări de lateralitate cu scopul de a realiza întinderea picăturii de sînge pe marginea de contact dintre cele două lame, printr-o mișcare de translație uniformă, nu prea rapidă și sub un unghi de cca 45°, se întinde picătura de sînge în lungul lamei degresate, de la dreapta la stînga. Imediat după întinderea sîngelui pe lamă, aceasta se va agita la aer pentru uscarea cît mai rapidă a frotiului. În caz contrar, elementele celulare sanguine se ratatinează.

Un frotiu corect executat trebuie să întrunească următoarele condiții:

— să fie subțire (elementele celulare într-un singur strat, fără a se suprapune sau aglomera pe diferite porțiuni);

— să aibă partea terminală sub formă de semicerc franjurat (ceea ce presupune ca picătura de sînge să se fi terminat de la sine prin întinderea pe lamă, deci convenabilă ca mărime);

— pelicula de sînge să nu acopere în totalitate lama, nici în lungime, nici în lățime;

— să nu existe goluri în pelicula de sînge (existența lor denotă o degresare defectuoasă a lamei pe care s-a întins sîngele);

— să fie uniform (existența unor striatțiuni, în care pelicula are grosimi diferite, denotă neuniformitate în deplasarea lamei șlefuite).

Uscarea frotiului va fi urmată de marcarea acestuia cu un creion negru sau cu un corp ascuțit, la baza acestuia, direct pe pelicula de sînge. Această metodă de marcarea este cea mai indicată întrucît nu se deteriorează în cursul procesului de colorare și conservare ulterioară.

În afara acestei metode „clasice“ de efectuare a frotiurilor, în unele laboratoare se folosesc în locul lamei șlefuite, penițe fine, topografice, perfect degresate; acestea se înmoaie într-o picătură de sînge după care se trasează pe lama degresată o linie subțire, ondulată sau dreaptă, transversală sau longitudinală. Viteza de execuție trebuie astfel potrivită încît linia să iasă de culoarea și transparența unui bun frotiu de sînge, cunoscînd că grosimea frotiului este invers proporțională cu rapiditatea

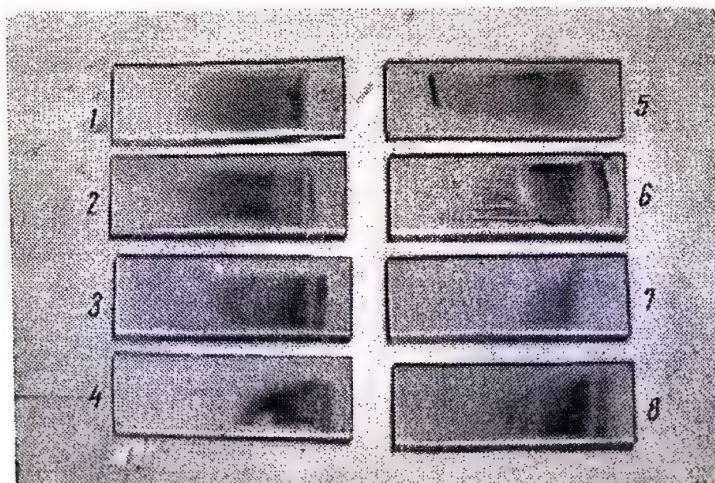


Fig. 133 — Aspectul unor frotiuri
(1 — corect; 2 — 8 incorecte)

cu care se trasează linia. Concomitent, se face și marcarea lamei la una din extremități, tot cu ajutorul peniței înmuiate în sînge.

După autorii care au inițiat această metodă, distribuția celulelor în frotiu ar fi mai uniformă decît pe frotiurile efectuate prin metoda clasică.

Aplicînd și noi, cu titlu experimental, această metodă am constatat că totuși frotiurile astfel obținute nu întrunesc avantajele prezentate de cei ce au inițiat-o.

Colorarea frotiurilor de sînge

Este necesar ca această operațiune să se facă la cît mai scurt interval (cîteva ore) după efectuarea frotiurilor, avînd în vedere că pe lamele vechi, nefixate, celulele se alterează modificîndu-și afinitățile tinctoriale. Dacă totuși acest lucru nu este posibil, ele se vor păstra pînă la colorare, ambalate în hîrtie curată, uscată, sau în cutii speciale cu renuri, ferite de umezeală, și fără ca suprafețele pe care se află pelicula de sînge să se atingă între ele.

Metodele și tehnicile de colorare a frotiurilor de sînge se aleg în funcție de scopul urmărit.

Metoda panoptică May Grünwald-Giemsa are cea mai largă utilizare în hematologie și este considerată ca cea mai completă pentru studiile de morfologie celulară sanguină. Pentru ea sînt necesare următoarele materiale:

- plăci Petri cu suporți de sticlă, lemn, material plastic
- pipete Pasteur
- soluție May Grünwald
- apă distilată neutră sau apă tamponată
- soluție Giemsa

Tehnica de colorare. Se așază frotiurile (cu pelicula de sînge în sus) pe suporții din interiorul plăcilor Petri, astfel încît să nu se atingă între ele și nici de pereții plăcii;

— se acoperă lamele cu un număr cunoscut de picături de soluție May Grünwald. Se acoperă placa, pentru ca să se împiedice evaporarea alcoolului conținut de soluție și se lasă în contact 3 minute, realizînd în acest fel fixarea frotiului;

— fără a vărsa soluția May Grünwald de pe lame, se adaugă același număr de picături de apă distilată neutră sau apă tamponată, lăsîndu-se în contact 1 minut, timp în care este bine ca plăcile să se încline ușor, prin mișcările de balansare, pentru a realiza un bun amestec al apei distilate cu soluția May Grünwald, care devine astfel hidroalcoolică și ca urmare colorantă;

— se răstoarnă apoi amestecul de pe lamă și fără să se spele, se trec frotiurile în baia Giemsa pregătită ex tempore, unde se lasă 20—30 minute (baia Giemsa se prepară în pahare Borel, Berzelius sau băi Laveran, calculînd pentru fiecare 2 ml apă distilată neutră cîte 3 picături de soluție Giemsa concentrată);

— se scot apoi lamele din baia Giemsa și se spală sub un jet nu prea puternic de apă de robinet, care în caz contrar ar putea antrena granulațiile unor leucocite (mai ales ale bazofilelor care sînt mai sensibile). Se șterge dosul lamelor și se așază în poziție înclinată pentru

uscare la temperatura camerei. Frotiurile uscate se pot examina ca atare sau după montarea pe suprafața lor, cu ajutorul balsamului de Canada, a unei lamele fine, cu scopul de a se asigura o conservare de mai lungă durată, în condiții optime, a frotiurilor (se va avea grijă ca între lamă și lamelă să nu se formeze bule de aer).

Rezultatele colorării panoptice: frotiul bine colorat are un aspect slab violaceu.

Examine la microscop, hematiile au o culoare cărămidie, nucleii sînt de culoare violacee, nucleolii albastru-palid, granulațiile eozinofile sînt portocalii, cele ale bazofilelor albastru-negru, cele ale neutrofilelor maron-închis iar granulațiile azurofile de nuanță roșie-purpurie.

În situația în care frotiul are o culoare albastră înseamnă că acesta a fost supracolorat, sau a avut o grosime excesivă. Ea se poate datora și unei insuficiente spălări după colorare.

Culoarea roșie a frotiurilor denotă fie o spălare prelungită, fie o colorare insuficientă, fie aciditatea coloranților sau a diluantului.

Apariția precipitatelor pe frotiu se poate datora spălării insuficiente, uscării frotiului în timpul colorării sau sedimentării colorantului (trebuie filtrat).

Frotiurile supracolorate se pot decolora cu alcool metilic p.a. timp de cîteva minute (se urmărește virarea culorii frotiului), în timp ce insuficienta colorare poate fi remediată prin recolorarea cu soluție Giemsa diluată, pînă se obține culoarea corespunzătoare.

Metoda Giemsa rapidă folosește un amestec format din o parte colorant Giemsa cu 2 părți alcool metilic absolut (este esențial ca alcoolul metilic să fie de bună calitate). Practic, pentru un frotiu se amestecă într-o eprubetă uscată 10 picături de colorant Giemsa cu 20 picături alcool metilic și se acoperă frotiul cu întreaga cantitate din acest amestec, timp de 30 secunde;

— se adaugă un volum egal de apă distilată neutră, se omogenizează amestecul cu o pipetă Pasteur și se lasă în contact 2 minute;

— se aruncă soluția colorantă de pe lamă și se acoperă frotiul cu apă distilată neutră, lăsîndu-se astfel 30 de secunde;

— se lasă lamele să se usuce și se examinează.

Timpul de colorare este de 3 minute, iar rezultatele colorării sînt la fel de bune ca în metodele panoptice clasice.

Colorarea bazofilelor. Pentru colorarea granulocitelor bazofile se procedează la următoarea tehnică de colorare a frotiurilor:

— fixare și colorare concomitentă, timp de 5 minute cu soluție de albastru de toluidină 1% în alcool metilic;

— spălare cu apă de robinet și uscare la aer.

Granulele bazofilelor apar colorate metacromatic în roșu-violet, restul celulelor fiind colorate în albastru-deschis. Granulațiile toxice din neutrofile, cele ale promielocitelor, monoblaștilor și trombocitelor apar colorate tot metacromatic dar mult mai slab, încît nu se pot confunda.

Colorația vitală cu albastru de crezil pentru reticulocite. Se folosesc în acest scop două soluții:

Soluția 1:

— Oxalat de sodiu	1,0 g
— Ser fiziologic	100,0 ml

Soluția 2:

- Albastru de crezil 1,0 g
- Ser fiziologic 100,0 ml

Tehnica de colorare. Într-o eprubetă mică (de seroreacție) se pun în următoarea ordine:

- soluția 1 — 12 picături
- soluția 2 — 3 picături
- sânge — 3—4 picături

Se lasă în repaus 2 ore, timp în care eritrocitele sedimentează. Se ia apoi cu o pipetă Pasteur din sediment o cantitate oarecare din care se efectuează frotiuri obișnuite. Se pot supracolora prin metoda panoptică May Grünwald-Giemsa.

Rezultatul colorării: pe fondul gălbui al eritrocitelor necolorate (sau de culoare roz dacă eritrocitele sînt colorate), apare substanța granuloreticulo-filamentoasă colorată în albastru intens, caracteristică reticulocitelor.

Colorarea corpiilor eritrocitari. Corpii eritrocitari care apar în unele anemii hemolitice cu methemoglobinemie și sulfhemoglobinemie, se evidențiază prin aceeași colorație ca pentru reticulocite, folosind însă o soluție de sulfat de albastru de Nil 0,5% în alcool absolut. Ei apar colorați în albastru-închis, iar eritrocitele în galben-verzui.

Evidențierea peroxidazelor pentru seria granulocitară. Colorarea peroxidazelor se folosește pentru diferențierea leucemiei granulocitare de alte tipuri de leucemie, cînd celulele sînt relativ nediferențiate. Se pot folosi în acest scop următoarele metode:

Metoda I. Sînt necesare două soluții:

Soluția A: 0,5% sulfat de cupru în apă distilată

Soluția B: soluție saturată de benzidină bază CP (aceasta se obține prin mojararea a 0,2 g benzidină împreună cu cîteva picături de apă distilată, urmată de completarea cu apă distilată pînă la volumul de 200 ml. Se filtrează și se adaugă 4 picături de soluție 3% de peroxid de hidrogen. Soluția poate fi păstrată la întuneric sau într-o sticlă brună). Este necesar să se verifice eficacitatea acestor soluții; amestecînd soluție A cu soluție B trebuie să apară o culoare albastră. În caz contrar, se verifică soluția B care nefiind saturată determină deficiența semnalată.

Tehnica de colorare. Se acoperă frotiul pentru 30 de secunde cu soluție A

- Se spală ușor și se transferă în soluție B pentru 2 minute
- Se spală cu grijă și se diferențiază cu soluție apoasă de safranină 1% timp de 2 minute
- Spălare, uscare la aer și eventual montare.

Rezultat: acțiunea de oxidare a benzidinei asupra sistemului peroxid-peroxidaze rezultă din producerea unor granule intracelulare de culoare albastră-verzuie sau brună în neutrofile și eozinofile. Monocitele pot prezenta ocazional cîteva granule de peroxidaze. Limfocitele, eritrocitele, plasmocitele, trombocitele, celulele sistemului reticulo-histiocitar nu conțin peroxidaze. Este totuși posibil ca uneori celulele reticulo-histiocitare să dea slabe reacții pozitive, acest lucru întîmplîndu-se în situațiile în care ele au fagocitat elemente mieloide.

Metoda Graham-Knoll pentru peroxidaze necesită următorii reactivi:

— soluție alcoolică de formol 10% (10 părți formol 40% + 90 părți alcool 96°)

— soluție de benzidină (se dizolvă 30—50 mg benzidină gălbuie în 6 ml alcool 96° diluat cu 40 ml apă distilată, la care se adaugă 0,2 ml apă oxigenată; soluția se poate conserva 5 zile în sticle cu dop rodat)

— Soluție Giemsa (10 picături sol. Giemsa concentrată la 15 ml apă distilată neutră).

Tehnica de lucru. Frotiurile (care nu trebuie să fie mai vechi de 2 zile) se fixează timp de 30 secunde (strict) în soluția alcoolică de formol.

— Se varsă formolul de pe lamă și se acoperă frotiurile cu soluție de benzidină, lăsându-se în contact 5 minute.

— Se spală temeinic cu apă de robinet și se usucă.

— Se introduce în soluție Giemsa diluată unde se țin 1—2 ore.

Rezultatul:

Granulațiile de peroxidaze sînt galbene-verzui, cu nuanțe de brun, de diferite intensități.

Metoda este utilă pentru diferențierea celulelor de origine limfatică, care sînt peroxidazo-negative, de cele de origine medulară, peroxidazo- pozitive.

Evidențierea peroxidazelor în eozinofile se poate obține prin colorarea frotiurilor prin metoda May Grünwald-Giemsa, cu mențiunea că soluției Giemsa diluată trebuie să i se adauge soluție de benzidină diluată în proporție de 1 ml sol. benzidină diluată la 10 ml soluție Giemsa diluată.

Prin această metodă nu pot fi puse în evidență peroxidazele în nici un alt tip de celule decît în eozinofile.

Reacția pentru oxidaze, ca și cea a peroxidazelor, servește la diferențierea elementelor mieloice de cele limfocitare, în special în cazurile de leucoză cînd singur examenul morfologic al singelui nu permite stabilirea tipului de leucoză (limfoidă sau mieloblastică).

Metoda se bazează pe sinteza albastrului de indofenol în prezența oxidazelor.

Reactivi: amestec fixator (amestec în părți egale de formol 40% cu alcool absolut).

— Soluția 1:

— alfa-naftol	1,0 g
— NaOH N/10	1,0 ml
— Ser fiziologic	100,0 ml

— Soluția 2:

— paradimetil-parafenilen-diamină (bază)	1,0 g
— ser fiziologic	100,0 ml

Soluția 1 se prepară în felul următor:

se fierbe serul fiziologic și se adaugă în timpul fierberii 1,0 g alfa-naftol și 1 ml NaOH N/10 picătură cu picătură. După răcire se filtrează, soluția putînd fi păstrată timp de 4 săptămîni la întuneric.

Tehnica de lucru. Se introduce frotiurile în amestecul fixator, se lasă 2 ore.

— Se transferă apoi lamele în soluția colorantă de lucru (aceasta se obține amestecând 1 volum soluție 1 cu 4 volume soluție 2) filtrată, în care se lasă timp de 3 minute.

— Se spală cu apă și se usucă.

— Se introduce apoi în safranină 1% pentru 1—3 minute, în scopul colorării nucleilor.

Rezultatele acestei reacții sînt aceleași cu ale peroxidazelor.

La interpretarea frotiurilor se va ține seamă de faptul că paramieloblaștii dau inconstant reacție peroxidazică pozitivă; ca urmare o reacție negativă nu poate exclude prezența paramieloblaștilor. În schimb, reacția pozitivă exclude prezența seriei limfocitare.

Reacția pentru fosfataza alcalină este utilă pentru diferențierea leucozei mieloid cronice de reacțiile leucemoide privind seria granulocitară.

Activitatea fosfatazei alcaline poate fi pusă în evidență numai în citoplasma granulocitelor neutrofile segmentate (care în mod normal au o activitate fosfatazică alcalină slabă). Monocitele, limfocitele, eozinofilele, plasmocitele și celulele tinere, blastice, nu prezintă activitate fosfatazică alcalină.

În reacțiile leucemoide privind seria granulocitară (infecții acute, infecția tuberculoasă, carcinomatoza, anemii hemolitice, policitemie adevărată, mieloscleroză) activitatea fosfatazei alcaline este mult intensificată.

În leucoza mieloidă activitatea fosfatazei alcaline este slabă sau lipsește total; nu apar celule cu reacții intens pozitive.

Tehnica de lucru. Se fixează frotiurile timp de 30 secunde într-un amestec format din 10 ml formol și 90 ml alcool metilic absolut.

— Se spală cîteva secunde.

— Se incubează timp de 2 ore la 37°C într-o soluție preparată ex tempore din:

— Veronal sodic 10%	30,0 ml
— Beta-glicerofosfat de sodiu 3%	30,0 ml
— Sulfat de magneziu M/10	30,0 ml
— Nitrat de calciu 2%	45,0 ml
— Apă distilată	165,0 ml

— Spălare cu apă distilată în care s-au pus cîteva picături de soluție de nitrat de calciu 2%, timp de cîteva secunde.

— Imersarea lamelor într-o soluție 2% de nitrat de cobalt, timp de 5 minute.

— Spălare temeinică, după care se acoperă frotiurile cu o soluție slabă de sulfură de amoniu (1 ml sulfură de amoniu la 80 ml apă), lăsîndu-se în contact 10 secunde.

— Se spală bine lamele.

— Se colorează cu soluție apoasă de safranină 2% timp de 10 secunde.

— Se spală temeinic și se usucă la aer.

Prezența activității fosfatazei alcaline este indicată de prezența unor precipitate negre-verzui în citoplasma granulocitelor neutrofile segmentate.

Reacția PAS pentru glicogen este utilă pentru diferențierea limfoblastului din leucoza acută (prezintă reacție PAS intens pozitivă) de mie-

loblast care are o reacție foarte discretă (citoplasma roz-difuză palid, fără granulații).

Materiale necesare:

- formol
- soluție de acid periodic 1% în apă distilată (poate fi conservată timp de 1 lună)

- reactiv Schiff (acid fucsine-sulfuros) care se prepară astfel: în 200 ml apă distilată la fierbere, se dizolvă 1 g de fucsină bazică fin pulverizată, agitând continuu. Se răcește pînă la temperatura de 50°C, se filtrează și se adaugă 20 ml acid clorhidric normal; cînd soluția este răcită la 25°C se adaugă 1 g de sulfat acid de sodiu (bisulfat de sodiu) anhidru (SO_3HNa p.a.). Se lasă soluția la temperatura camerei, la întuneric, timp de 24 ore, după care se adaugă 2 g de cărbune activ, agitând amestecul timp de 1 minut. Se filtrează imediat și se păstrează ermetic închisă, la întuneric, la 4°C. Soluția trebuie să fie incoloră sau cu o tentă gălbuie foarte discretă. Cînd soluția devine roșie nu mai poate fi utilizată. Pentru a putea fi folosită, soluția se lasă să se încălzească la temperatura camerei;

- apă sulfuroasă pentru spălare, preparată ex tempore din:

- sulfat acid de sodiu 10% 10,0 ml
- acid clorhidric N 10,0 ml
- apă distilată 200,0 ml

- soluție 1% de verde-lumină sau hematoxină soluție apoasă 1%.

Tehnica de lucru. Se fixează frotiurile prin vapori de formol, timp de 5—10 minute.

- Spălare abundentă cu apă distilată.

- Tratare cu soluție de acid periodic timp de 7—10 minute.

- Spălare cu apă distilată.

- Se trec apoi frotiurile în reactivul Schiff, lăsându-le astfel 20—30 minute, la întuneric.

- Spălare în apa sulfuroasă, cîte 2—3 minute, de 3—4 ori, schimbînd soluția după fiecare spălare.

- Spălare cu apă de robinet, sub jet, timp de 10 minute.

- Uscarea frotiurilor.

Se poate folosi pentru colorarea fondului soluția de verde-lumină sau hematoxină (sol. apoasă 1%).

Întrucît prin reacția PAS se colorează nu numai glicogenul ci și mucoproteinele, cerebrozidele, fibrina, mucina, este necesar ca reacția să fie verificată cu un martor al cărui glicogen a fost digerat cu salivă (lama fixată și uscată se va acoperi cu salivă centrifugată, lăsîndu-se astfel timp de 60 minute la temperatura camerei, după care se spală și se colorează după tehnica expusă).

Rezultatul: glicogenul apare sub forma unor granulații roșii în citoplasmă.

Limfocitele și monocitele dau o reacție slab pozitivă, cu granulații rare, fine. Trombocitele și megacariocitele au o reacție mai intens pozitivă.

Limfoblastul în leucoza acută prezintă o reacție PAS intens pozitivă, prezentînd numeroase granulații roșii în citoplasmă, ceea ce îl diferențiază de mieloblast la care reacția PAS este slabă, citoplasma fiind de culoare roz-palid, difuză, fără granulații.

Evidențierea siderocitelor pe frotiuri de sînge

Punerea în evidență a siderocitelor pe frotiurile de sînge este utilă pentru diagnosticul diferențial al anemiilor feriprive față de alte anemii sideremice. În corelație cu datele clinice, acest test poate fi utilizat ca mijloc de diagnostic în anemia infecțioasă a calului.

Tehnica de lucru. Frotiurile se colorează mai întii panoptic (May Grünwald Giemsa), se usucă și se acoperă apoi lamele cu următoarea soluție preparată ex tempore:

- Ferocianură de potasiu 1,0 g
- Acid clorhidric 37% purissim 1,0 ml
- Apă bidistilată 100,0 ml

Cu această soluție lamele rămîn în contact timp de 4—5 minute.

Se spală apoi cu apă distilată, se usucă și se examinează.

În funcție de celula examinată, granulele de fier apar în număr variabil, fiind de dimensiuni mici și de culoare albastră.

Această metodă are avantajul că permite și diferențierea morfologică a elementelor celulare sanguine.

Valoarea frotiului de sînge

Studiul sistematic al frotiului de sînge pune la dispoziția medicului specialist multiple și valoroase date, pe care nici un alt test hematologic nu le poate furniza, cu condiția ca acesta să fie complet și efectuat de către un expert în probleme de hematologie.

Examinarea frotiului de sînge colorat trebuie să se facă cu multă atenție, apreciindu-se nu numai aspectul microscopic ci și cel macroscopic.

Prin examenul macroscopic se apreciază:

- calitatea frotiului: subțire, cu marginile paralele și terminat pe lamă cu franjuri, presărat cu zone mici rotunde necolorate (lamă nedegresată sau sînge medular), uniform etc.;

- culoarea frotiului: slab violacee, omogenă, albastră sau roz, neomogenă (zone palide alternînd cu zone intens colorate).

Examenul microscopic se începe cu un obiectiv uscat, apreciindu-se:

- celularitatea (numărul de celule nucleate)
- distribuția celulelor
- prezența de celule anormale

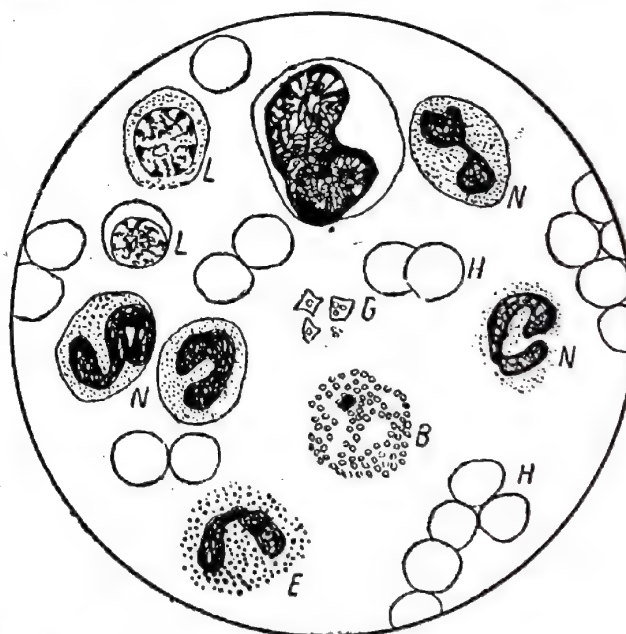


Fig. 134 — Principalele elemente figurate ale sîngelui la mamifere

H — hematii; L — limfocite de talie diferită; N — neutrofile; E — eozinofil; B — bazofil; G — plachete sanguine; M — monocit

— alegerea zonei pentru examenul cu imersie care se face în următoarea etapă și care include:

a) Cercetarea eritrocitelor

— mărimea (macrocitoză, microcitoză, anizocitoză, normocitoză)
— forma (poikilocitoză, sferocitoză, celule falciforme, celule „în țintă”, ovalocitoză)

— culoarea (normocromic, hipocromic, hiperchromic)

— forme anormale (policromatofilie, eritrocite cu punctații bazofile, inele Cabot, corpi Howell-Jolly, formare de rulouri, eritrocite parazitare, eritroblaști)

b) Cercetarea leucocitelor

Raportul procentual al diferitelor tipuri de leucocite (formula leucocitară).

În acest scop se va proceda la examinarea frotiului după o anumită conduită și anume parcurgînd în zig-zag cele două margini, deplasarea făcîndu-se într-o singură direcție.

Se înregistrează într-un tabel fiecare leucocit întîlnit, în dreptul simbolului celulei respective. Pentru a reduce cît mai mult erorile, este obligatoriu să se numere cel puțin 200 de leucocite.

Înregistrarea procentului diferitelor tipuri de leucocite precum și a numărului total de elemente albe pe care s-a făcut formula leucocitară, se poate face cu ajutorul unor „contoare” mecanice sau electronice, foarte comod de manipulat de către examinator.

Leucocitele anormale (care se vor descrie în detaliu), se includ în numărul total de leucocite.

Celulele fragmentate sau degenerate, neputînd fi identificate, nu se includ în numărătoare: ele se notează separat și se exprimă procentual, ca și celulele altor serii (eritroblaști, celule reticulare ș.a.).

Este indicat ca rezultatul final să reprezinte media leucocitelor de pe două frotiuri „pereche”, executate din aceeași picătură de sînge.

Rezultatele formulei leucocitare trebuie să fie corelate cu numărul total de leucocite stabilit prin hemocitometrie.

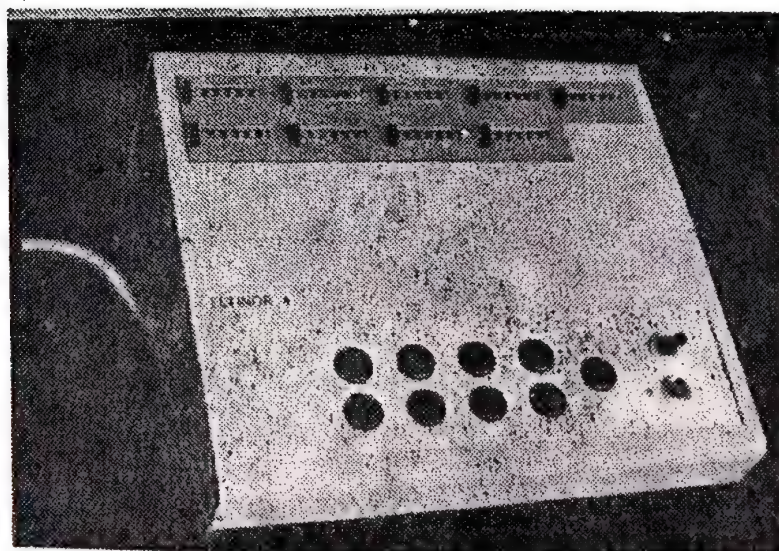


Fig. 135 — Contor electric pentru numărători de elemente figurate sanguine

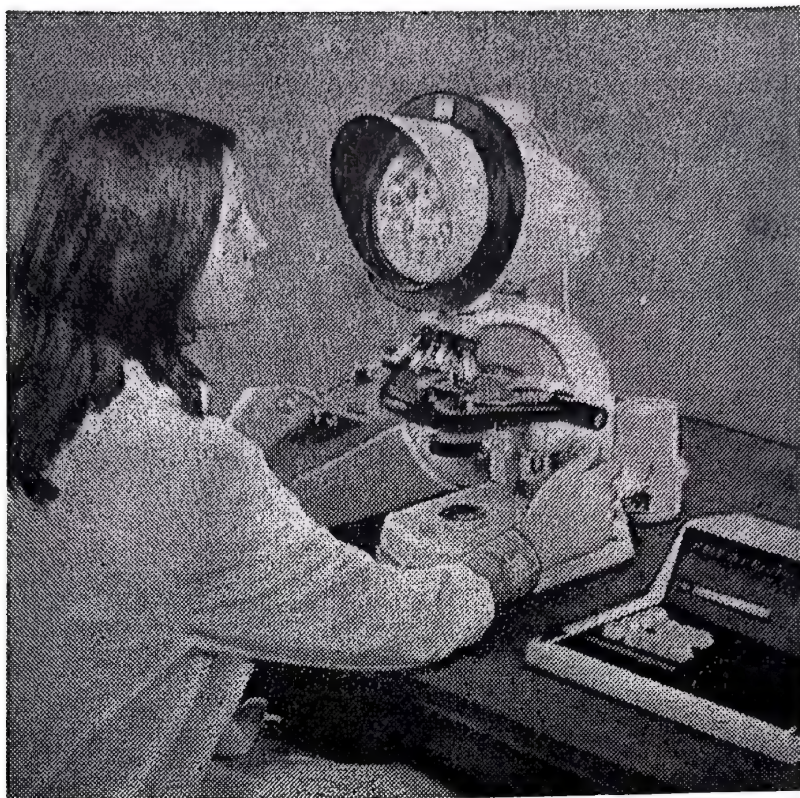


Fig. 136 — Efectuarea formulei leucocitare și examenul morfologic al singelui cu ajutorul microscopului cu ecran de proiecție

Criteriile de identificare a fiecărui tip de celule sînt:

- dimensiunile celulei;
- nucleul: poziție, formă, culoare, structură cromatiniană, membrana nucleară, prezența sau absența nucleolilor;
- citoplasma: cantitatea relativă (raportul nucleo-citoplasmatic), culoarea, prezența sau absența haloului perinuclear, granulații (mărime, culoare, număr, distribuție).

Erori ale formulei leucocitare:

- mecanice (de recoltare, executare și colorare a frotiului, de repartitie neomogenă a celulelor pe frotiu — de obicei celulele mari se distribuie pe marginile frotiului, iar celelalte spre centrul acestuia);
- de eșantionaj (nu poate fi exclusă dar poate fi redusă dacă se numără cît mai multe celule — 200 și peste);
- de interpretare (depinde de competența examinatorului).

Anomalii morfologice. Granulocite: gigante și cu mai mulți lobi — macropolicite; hipersegmentare — pleiocariocite; cu corpi Döhle — zone bazofile în citoplasmă; cu granulații toxice; hipogranulare; cu carioschize — mici pedunculi ai nucleului; granulocite cu anomalii ereditare calitative nucleare (lipsa de segmentare și picnoza nucleului, hipersegmentarea); anomalii ereditare citoplasmatic (prezența de granulații azurofile mari în granulocite, limfocite și monocite, vacuole pline cu granulații azurofile mari, prezența de corpi Döhle); anomalii ereditare cantitative (eozinofilia familială, neutropenia constituțională).

Identificarea anomaliilor morfologice este de mare importanță pentru diagnostic; ea depinde foarte mult de calitățile frotiului care trebuie să fie ireproșabile.

Celulele anormale care nu se pot identifica se înregistrează ca „celule atipice” și ele trebuie să fie descrise amănunțit pe buletinul de analiză.

c) Cercetarea trombocitelor pe frotiul de sînge

— numărul se apreciază după aceleași reguli ca și în cazul leucocitelor; numărătoarea trombocitelor pe frotiul de sînge trebuie controlată cu numărarea directă a acestora în hemocitometru.

— anomalii morfologice (anizocitoză trombocitară, prezența de micro-, macro- și megalotrombocite, modificări ale granulomerului).

— aglutinabilitatea se apreciază calitativ și cantitativ, numărîndu-se cîte grupuri de trombocite se găsesc la 100 de trombocite izolate.

Morfogenie și tinctorialitate celulară

Pentru o interpretare corespunzătoare a frotiului de sînge sau de măduvă osoasă (prin examen microscopic) trebuie să se aibă în vedere, pe lîngă criteriile menționate, și următoarele aspecte de morfologie și tinctorialitate celulară:

— *celulele nediferențiate*, foarte tinere (așa-numitele celule „blastice”: eritroblaști, plasmoblaști, mieloblaști etc.), se caracterizează prin:

— nucleu voluminos, conținînd nucleoli

— protoplasmă abundentă

Cu cît celula este mai tînă, rețeaua de bazicromatină este mai fină, se colorează mai metacromatic, violet către roșcat.

Nucleolii sînt cu atît mai voluminoși, cu cît activitatea lor este mai mare, colorîndu-se în albastru ortocromatic.

Protoplasma „blaștilor”, bogată în ARN (mesager, ribozomial, de transfer), se colorează în albastru ortocromatic, intensitatea culorii fiind direct proporțională cu densitatea ARN-ului. Fusul nuclear se colorează metacromatic bordo-violaceu cu azurul de metilen.

Capacitatea mitotică este cu atît mai mare cu cît celula este mai tînă;

— *celula matură*, funcțională (poartă sufixul de „cit”: eritrocit, granulocit, plasmocit etc.) are raportul nucleo-plasmatic inversat. Nucleolii dispar.

Cromatina nucleară este mai densă, metacromatic violet-închis.

Dispare ortobazofilia citoplasmei; apar însă organite specifice: granulații funcționale specifice și aparatul enzimatic celular (se pune în evidență prin tehnici speciale de enzimocitologie);

— *formele de tranziție* între „blast” și „cit”, poartă prefixul „pro” (promielocit, proplasmocit etc.); morfologic și tinctorial prezintă caractere intermediare.

Bazicromatina este mai densă.

Nucleolii sînt pe cale de dispariție.

Protoplasma mai puțin ortocromatic bazofilă.

Granulațiile tinere au o tentă albastruie, alături de afinitatea tinctorială specifică.

Particularități morfo-tinctoriale ale elementelor figurate pe specii de animale

Pentru medicul veterinar clinician, în sarcinile căruia ar trebui să intre și diagnosticul hematologic, dificultățile sînt mult mai mari decît pentru medicul uman, avînd în vedere diversitatea speciilor de animale cu care operează.

În funcție de specie, vîrstă și uneori și de alți factori, elementele figurate ale singelui prezintă anumite particularități morfologice, dintre care cele mai importante sînt redată în cele ce urmează.

La cabaline. Elementele roșii au dimensiuni cuprinse între 4—7,5 microni (majoritatea lor au diametrul de 4,5—5,5 microni), fiind în general uniforme, lipsite de punctare bazofilă; ocazional se pot găsi corpusculi Jolly. Forme imature nu se găsesc în mod normal aproape niciodată în singele periferic.

Tabloul leucocitar este caracterizat de predominanța neutrofilelor.

Neutrofilul are cromatina neuniformă iar membrana apare zimțată, dînd impresia de multilobulație. Cu toate că pot fi observate filamente, ele sînt în general rare. Din cauza condensării cromatice de la marginea nucleară, aceasta apare la neutrofilul tînăr mai neregulată la cal decît la celelalte specii. În comparație cu neutrofilul matur, nucleul formelor tinere este mai voluminos, mai puțin boselat și de obicei nu este încolăcit.

Citoplasma are în mod normal granule foarte fine, pulverulente, de culoare roz.

În condiții de toxiemie, citoplasma nu-și continuă procesul de maturare și apare ușor albăstruie, conținînd uneori granulații toxice. Semne de toxiemie apar și în bolile însoțite de depresiunea granulopoezei și în tulburări gastrointestinale grave. În asemenea cazuri, este posibilă apariția de metamielocite. Așa spre exemplu, în salmoneloza acută, alături de leucopenie apar și neutrofile imature, de dimensiuni mai mari, cu nucleul tumefiat, cu spații paracromatice mai abundente, dînd nucleului o nuanță roșiatică, în timp ce citoplasma are o colorație mai bazofilă.

Eozinofilul se deosebește de eozinofilul altor specii, datorită granulelor sale foarte mari (2—3 microni) care umplu aproape în întregime citoplasma. Conturul celular urmează conturul granulelor care, fiind de dimensiuni mari, imprimă un aspect muriform celulei. Granulele sînt de culoare roșie-orange intensă și frecvent sînt atît de numeroase încît maschează parțial nucleul.

Citoplasma, de culoare albastru-pal, se poate observa numai în spațiile dintre granule și la periferia celulei.

Bazofilul are granulații brune-închise, neregulate ca mărime și formă, putînd fi tasate sau dispersate în citoplasmă, uneori și peste nucleu.

Limfocitul. Majoritatea limfocitelor sînt mici, cu nucleu intens colorat și citoplasmă redusă. Limfocitele, care ating dimensiunile monocitelor, au o cromatină nucleară omogenă și o cantitate importantă de citoplasmă, de asemenea omogenă, albastră-deschisă. Granulele azurofile pot fi găsite uneori în citoplasma limfocitelor; ele sînt mici, de formă neregulată.

Monocitul are citoplasma albastră-cenușie, granulară, presărată cu granule azurofile și mici vacuole uneori. Forma cea mai caracteristică

a nucleului este cea reniformă, cu poziție excentrică. Cromatina apare dantelată și fibrilară, dar poate fi și conglomerată.

Trombocitele. Dintre speciile de animale domestice, calul are cel mai mic număr de trombocite. Ele apar colorate pal, cu citoplasma albastră-deschisă, conținând granule azurofile fine. Ele variază, ca formă, de la cea ovală la forme alungite, uneori putând fi întâlnite și forme gigante, de dimensiunile eritrocitelor.

La bovine. Hematiile sînt în general normocite, cu valori limite de la 4,4—7,7 microni. Pot fi întâlnite adesea și forme gigante de elemente roșii, (megalocite), poikilocite, cu policromazie, punctare bazofilă, corpusculi Jolly.

Tabloul leucocitar este predominat de limfocite.

Neutrofilele sînt relativ mari (10—15 microni), nucleul lor prezentînd de cele mai multe ori un lob separat de segmentul principal printr-un filament fin. Citoplasma conține numeroase granule pulverulente, distincte.

Neutrofile imature nu apar în mod normal în mai mult de 1—2% din cazuri. Nucleul acestora este mult mai voluminos, iar citoplasma neomogenă.

În fazele inițiale ale proceselor inflamatorii acute (peritonite, pericardite, mastite acute) în circulația periferică vor apare neutrofile imature. În stări toxice, apar metamielociti cu citoplasma bazofilă și neutrofile imature, cu citoplasma vacuolată. Dacă granulele sînt mari și mai puține numeric, se apreciază că granulația este toxică. Tot în aceste stări, în neutrofilele mature pot apărea granulații roșii de dimensiuni mari, pe lângă granulațiile uniforme, pulverulente, specifice.

În bolile supurative acute, cînd toxemia este atît de severă încît granulopoeza este inhibată, pot apărea forme precursorare, puternic vacuolate, forme gigante cu nucleu și citoplasmă bazofilă conținînd granule toxice.

Eozinofilul are mărimea medie de 12—14 microni. Se recunoaște prin granulele numeroase de dimensiuni reduse, rotunde, uniforme, de culoare roșie-portocalie, care umplu aproape întreaga citoplasmă.

Citoplasma are o culoare albastră-deschisă, iar nucleul poate fi parțial acoperit de granule, dar nu complet mascat. El poate fi bilobat, dar de cele mai multe ori este compact.

Bazofilul variază ca mărime între 10—12 microni, avînd o structură densă, intens colorată, din cauza nucleului care este contractat și acoperit de granulele albastre-închise pînă la negru. Pentru acest motiv forma nucleului nu este ușor de recunoscut. Apare rar în singele periferic.

Limfocitul este cel mai important element alb din singele bovinelor, predominînd numeric, (59—70%). Dimensiunile variază între 8—15 microni diametru; formele mari au fost numite celule de tranziție, putînd fi confundate chiar cu monocitele. În caz de dubiu, decizia trebuie să fie luată în favoarea limfocitului.

Limfocitul mic are un nucleu rotund, dens, intens colorat, care ocupă aproape întreaga celulă, încît citoplasma este de cele mai multe ori aproape invizibilă.

Limfocitul mijlociu are nucleul mai puțin intens colorat, cu cromatina neuniformă; el este rotund dar poate avea o ușoară escavație a

membranei nucleare. Citoplasma este reprezentată de o bandă subțire, limitată la una din părți, dar poate să înconjoare și complet nucleul. Ea are o culoare albastră-deschisă, uneori putînd fi neuniform colorată.

Linfocitul mare are un nucleu mai puțin intens colorat, cu o rețea de cromatină neuniformă, cu contur rotund, situat de obicei excentric, uneori cu aspect reniform.

Forme mai tardive, denumite celule Rieder, pot fi văzute în leucoza limfoidă. Citoplasma este în acest caz albastră-pală, înconjurînd complet nucleul (în formă de treflă), prezentînd ocazional vacuole mici, rotunde.

Relativ frecvent dar nu constant, se pot observa în celule granulații azurofile, variabile ca dimensiuni, forme și număr, de culori variînd de la roșiatic la albăstrui.

La bovine, au mai fost descrise și limfocite de culoare albastră-închisă, denumite celule Türck. Numărul unor asemenea celule poate fi crescut în bolile toxice.

Monocitul are dimensiuni variabile între 13—20 microni. Nucleul este variabil ca formă, de la rotund la încurbat, ultimul aspect fiind cel mai frecvent. Cromatina este de obicei difuză și apare fibrilară, dar poate prezenta și zone mai închise, asemănătoare cu cele din limfocite. Citoplasma tinde să fie mai deschisă decît a limfocitelor și este mai granulară. Frecvent, apar vacuole, mai puțin regulate și numeroase decît în limfocite. Granule azurofile veritabile nu sînt prezente în mod obișnuit.

Monocitele nu sînt numeroase în sîngele normal bovin, dar ele tind să dispară în cursul fazelor acute de boală, în timp ce în procesele inflamatorii numărul lor crește.

Trombocitele au de obicei dimensiuni reduse, putînd însă apărea și forme gigante. În general, ele apar în grămezi mai mult sau mai puțin numeroase. Pachete izolate pot să se suprapună eritrocitelor. Aspectul lor obișnuit este acela de granule roșii-purpurii, înconjurate de citoplasmă albastră, cu membrană fină.

La ovine. Hematiile sînt în general rotunde, cu dimensiuni cuprinse între 2,5—7 microni. Ele prezintă un ușor grad de anizocitoză. Policromazia este foarte rară, ceva mai frecvent apărînd corpusculi Jolly. Rareori, se găsesc reticulocite.

Tabloul leucocitar are un caracter limfocitar.

Neutrofilul are nucleu de obicei multilobat, cu cromatina fragmentată și filamente scurte. Citoplasma este slab colorată iar granulația este fină, pulverulentă, difuză. Adesea, apar granule de dimensiuni mai mari și mai slab colorate, pe fondul obișnuit al citoplasmei.

Neutrofilul tînăr are nucleul voluminos, în formă de „U” sau cu prelungiri în formă de „S”. Citoplasma este mai albastră și mai puțin granulară. Este probabil ca bazofilia citoplasmei să fie expresia maturării incomplete în cazul bolilor toxice.

Eozinofilul are granule uniforme ca mărime, ovoide, de culoare roșie-oranj. Citoplasma este intens încărcată cu granule. Adesea, apare un strat subțire de citoplasmă albastră la marginea celulei.

Bazofilul prezintă un număr variabil de granule cu un halo roșiatic, contrastînd evident cu nucleul intens colorat. Membrana celulei poate fi neregulată.

Limfocitul are dimensiuni variabile dar împărțirea în limfocite mari și mici este mai dificilă decât la bovine.

Limfocitele mari nu dispun de particularități, ceea ce face ca ele să fie ușor de confundat cu monocitele. Nucleul tuturor formelor are o cromatină uniformă și ocazional colorată ușor în roșiatic. Marginile nucleare sînt netede, cu contur rotund sau oval. Citoplasma este albastră distinct și înconjoară în totalitate nucleul. Se poate observa adesea un halo perinuclear. De asemenea pot apărea uneori granule azurofile, variabile ca număr și dimensiuni.

Monocitul are un nucleu relativ intens colorat, de formă obișnuit ameoboidală, fiind trilobat. Citoplasma este albastră-cenușie, cu o textură granulară. Colorabilitatea este mai intensă decât a limfocitului mare.

Trombocitele apar în grămezi, sînt purpurii pale, înconjurate de o membrană fină care nu este întotdeauna vizibilă. Au adesea tendința de a se contopi în mase de dimensiuni variabile.

La porc. Singele de porc conține în mod normal forme inelare și rari normoblaști și hematii policromatice. La purcei, pot apărea în proporție de 1—13% celule vital granulate. De menționat că la această specie se produc foarte rapid deformări ale hematiilor.

Tabloul leucocitar la porc prezintă o predominanță a neutrofilelor a căror reprezentare este de 32—78,7%.

Neutrofilele au cromatina nucleară intens colorată, nucleul fiind adesea încolăcit, cu margini neregulate. Citoplasma are o culoare albastră-deschisă și este plină cu granule pulverulente de culoare roz ceea ce face ca adesea culoarea în ansamblu a citoplasmei să apară roz, după cantitatea de granule pe care o conține.

În cazul recoltării singelui pe oxalat, în citoplasma acestor celule se pot observa cristale de oxalat.

În prima zi postpartum pot apărea în circulația periferică metamielocite cu nucleu voluminos, cromatina neuniformă, membrana nucleară netedă, iar citoplasma de culoare albastră-pal.

Eozinofilul are granule rotunde sau ovoide, colorate în portocaliu-deschis, umplînd complet citoplasma, adesea cu cîteva granule și peste nucleu. În fazele inițiale, nucleul poate fi reniform.

Bazofilul are nucleul de culoare albastră-violacee, cu cromatina netedă. Granulele pot lua aceeași colorație cu a nucleului sau pot fi mai închise. Ele sînt limitate de obicei la citoplasmă, rareori cîteva granule putînd apărea și peste nucleu. Forma granulelor este sferică sau ușor ovală.

Limfocitul. Nucleul limfocitului mic este de dimensiuni mari, reprezentînd aproape întreaga celulă, citoplasma fiind redusă la un strat foarte subțire, pe una din laturi sau poate constitui un inel subțire în jurul nucleului. Forma nucleului este ovală, iar cromatina este netedă, prezentînd însă zone de condensare.

Limfocitul mare are un nucleu ceva mai slab colorat și cu cromatina mai fragmentată. Ocazional, apar în nucleu formațiuni inelare reprezentînd reminiscențe nucleolare. Se pot observa uneori granule azurofile, mai ales în limfocitele mici și mijlocii. Ele sînt de dimensiuni reduse, tinzînd să fie alungite și sînt situate la marginea celulei.

Monocitul are nucleul cu contur neregulat, suprafața ondulată. Cromatina este fibrilară sau dantelată. Citoplasma este destul de abundentă

și poate înconjura complet nucleul. Are o culoare albastră-cenușie, cu aspect neomogen datorită colorabilității variate. Granulația azurofilă este în general discretă.

Trombocitele au formă ovală, sînt aglomerate, colorate purpuriu-pal, sub formă de granule înconjurate de o citoplasmă albastră-pal. Sînt frecvent reunite în mase de mărimi variabile. Se pot întîlni adesea forme gigante, digitiforme.

La ciine. Hematiile cîinelui sînt foarte mari, comparativ cu ale altor specii domestice (5—9 microni diametru). Marea lor majoritate au zona centrală mai decolorată, imprimînd un aspect inelar. Ocazional, se găsesc corpusculi Jolly și hematii policromatice. Reticulocitele apar foarte rar la cîini adulți, în schimb la căței ele pot fi găsite în proporție de 20—40%.

Tabloul leucocitar este evident neutrofil (60—80%).

Neutrofilul are un nucleu multilob, cu proeminente rotunjite. Adesea, lobi sînt uniți numai printr-un filament de cromatină. Cromatina este grunjoasă sau aglomerată în mase intens colorate, contrastînd cu fondul slab colorat al celulei. Citoplasma apare pulverulentă, cu granulații difuze.

În procesele patologice pot să apară metamielociți neutrofili, cu nucleu sferoid sau reniform, cu cromatina mai difuză și colorabilitatea mai puțin intensă decît a neutrofilului matur. Citoplasma se colorează mai puțin intens și are un aspect granular, adesea cu o zonă mai palidă în porțiunea de escavație a nucleului.

În procesele inflamatorii și infecțiile bacteriene pot să apară în circulația periferică un număr crescut de metamielociți neutrofili și, mai puțin frecvent, progranulocite care imprimă un aspect de reacție leucemoidă.

În procesele toxice, citoplasma poate să apară intens vacuolară.

În deficiențele de vitamină B₁₂, se remarcă o hipersegmentare a nucleului neutrofilelor (5 sau mai mulți lobi).

Eozinofilul are granulații foarte variabile, fie de dimensiuni mici, regulate, fie de dimensiuni mari, neregulate. Uneori, pot apărea numai 2—3 granule cu diametrul de 3—4 microni. Culoarea lor normală nu este mai intensă decît a eritrocitelor din același frotiu. Rareori, nucleul poate fi parțial acoperit de granule, dar cel mai frecvent se poate vedea în întregime. Citoplasma are o colorație albastră-deschisă. Adesea, apar și vacuole de dimensiuni reduse.

Eozinofilele scad numeric în sînge sub influența corticosteroizilor, în timp ce eozinofilia este o reflectare a unei histaminemii crescute care determină atragerea eozinofilelor din măduva osoasă în circulația periferică pentru acțiunea antihistaminică.

Bazofilul are granulații care variază ca număr, mărime și intensitate de colorare, dar niciodată nu reușesc să mascheze prin număr nucleul sau să umple celula. Citoplasma este rugoasă, albastră-cenușie. Granulele bazofile sînt solubile în apă, astfel încît dacă frotiul este spălat excesiv, celula apare ca un monocit vacuolar.

Bazofilia apare de obicei în asociație cu eozinofilia, dar poate apărea și independent.

Limfocitul variază ca mărime, dar în sîngele periferic cel mai adesea apar limfocite mici. Nucleul este excentric, iar cromatina este gra-

nulată și slab colorată. Citoplasma este albastră-pal, mai slab colorată în jurul nucleului. Granulații albastre-închise sau roșii-azurofile pot apărea ocazional și în număr redus.

Limfocitul oferă indicii prognostice importante. O limfopenie persistentă în bolile cronice este în general de rău augur, în timp ce revenirea numerică a limfocitelor la normal poate fi interpretată ca un semn favorabil.

Monocitul este în general cea mai mare celulă albă dintre leucocitele mature. Caracteristica sa cea mai importantă este citoplasma bazofilă sau albastră-cenușie, grunjoasă. În mod obișnuit, ea prezintă vacuole variabile ca mărime și situate la una din extremități. Un alt fapt semnificativ este apariția granulelor azurofile pulverulente. Nucleul este extrem de variabil, semănând fie cu al neutrofilului tânăr, fie cu al metamielocitului tardiv. Cromatina nucleară este de obicei difuză. Adesea, nucleul tinde să fie amoeboid.

Trombocitele au mărimi variabile, cel mai frecvent fiind mici, rotunde, cu granulații azurofile înconjurate de o matrice albastră-deschisă. Uneori, se pot observa prelungiri în diferite direcții. Forme gigante, de dimensiunile hematiilor pot apărea în trombocitopenii cu tendință spre remisiune. Administrarea de steroizi stimulează trombocitoza.

La pisică. Hematiile au dimensiuni variabile între 3,2—7,5 microni; la animalele sănătoase pot apărea în număr mic hematii cu resturi nucleare Jolly, eritroblaști și hematii policromatofile. Se întâlnesc însă foarte frecvent la unele animale reticulocite, mai ales sub forma corpusculilor Schmauch.

Tabloul leucocitar, deși este dominat de neutrofile, predominanța acestora este mai redusă totuși decât la ciine.

Neutrofilele au un nucleu mare care umple aproape toată celula având aspect divizat, neregulat. Condensarea cromatinei nucleare determină apariția unor plăci mai închise la culoare, separate de zone mai slab colorate. Citoplasma este cenușie, cu granulații foarte fine. Metamielociti nu pot fi decelați în sângele periferic.

Eozinofilele au granule roșietice, numeroase, care pot să acopere parțial nucleul, fără a-l masca complet. Zonele reduse de citoplasmă ce se pot vedea între granule au o colorație albastră-deschisă.

Bazofilele sînt vizibile numai rareori în sângele periferic, acompăniind de cele mai multe ori eozinofilia. Bazofilul matur din sângele periferic are o citoplasmă cenușie-deschisă, conținînd granule mici, rotunde. Unele bazofile pot să conțină și granule mai închise.

Limfocitele. Cele mai multe sînt limfocite mici. Nucleul este obișnuit rotund, dar se pot observa și aspecte reniforme. Cromatina este relativ uniform dispersată, fără condensări marcante, iar marginile nucleului sînt distincte. Citoplasma este foarte redusă, situată de obicei într-o parte a celulei, datorită poziției excentrice a nucleului. Ea este albastră, uneori cu un halo perinuclear și condensare marginală. Rareori pot fi observate granule azurofile mici, dispuse marginal sau în escavația nucleului, cînd acesta este reniform.

Monocitele au nucleu rotund sau neregulat; cromatina este filamentoasă, uneori cu condensări. Citoplasma este albastră, ușor granulară, relativ intens colorată. În general, nu conține granulații azurofile, dar pot fi văzute vacuole citoplasmatică.

Trombocitele sînt de obicei mici, sferoide, cu granule azurofile înconjurate de o zonă pală pe un fond albastru. Mărimea lor este variabilă. Pot apărea forme gigante, de mărimea unui eritrocit. Uneori, ele apar alungite sau aglomerate, cu formarea de mase amorfe.

La iepuri. Eritrocitele se înscriu, ca dimensiuni, între 5—7,8 microni. Policromazia apare în mod normal, ca și punctarea bazofilă și eritroblastii, mai cu seamă la animalele tinere (pînă la un an). La animalele adulte se pot găsi reticulocite pînă la cca 8%, la nou-născuți procentul lor fiind mult mai mare 20—80%.

Tabloul leucocitar este predominat de obicei de limfocite. Neutrofilele lipsesc, dar se întîlnesc în schimb așa-numitele heterofile (polimorf-nucleare pseudoeozinofile).

Heterofilul are un nucleu polimorf și neuniform colorat (alternanțe de purpuriu-deschis și albastru-deschis). Citoplasma este roz difuză, din cauza fuziunii granulelor acidofile specifice. Granulele sînt în număr variabil, de culoare roșie, de dimensiuni mari, de formă rotundă, formă de bastonașe sau ambele.

Eozinofilul se distinge de heterofil prin dimensiunile sale mai mari și granulele caracteristice, intens azurofile, de cca 3—4 ori mai mari decît ale heterofilelor, de formă rotundă, umplînd celula.

Bazofilul este prezent în circulația periferică în mod constant. Nucleul are o colorație purpurie-deschisă, iar citoplasma este plină cu granule intens colorate pînă la negru metacromatic, ele fiind mari, de formă rotundă.

Limfocitul are morfologia asemănătoare cu a celorlalte specii. Dimensiunile sînt variabile, în cazul limfocitelor mari existînd și granule azurofile.

Monocitul este o celulă mare, cu un nucleu amoeboid, avînd cromatină puțin intens colorată, cu citoplasmă ce conține cîteva vacuole distincte. În infecții listeriene pot apărea granule eozinofile.

Trombocitele apar sub formă de grămezi de granule azurofile înconjurate de o citoplasmă albastră-deschisă.

La păsări. Tabloul sanguin la păsări este caracterizat de prezența hematiilor nucleate, de formă ovală, de dimensiuni mari (9—14/6—9 microni), alături de care se pot găsi în proporții variabile, uneori pînă la 75%, reticulocite. Ca și iepurii, ele nu posedă neutrofile, ci heterofile (pseudoeozinofile).

Tabloul leucocitar are un caracter predominant limfocitar.

Pseudoeozinofilul (heterofilul) conține granule azurofile în formă de bastonaș sau de fus, care se colorează în roșu strălucitor prin metoda panoptică. Caracterul amfofil al acestor granulații este dat de posibilitatea colorării lor cu coloranții pur acizi sau pur bazici; pe de altă parte termenul de pseudoeozinofil este datorat faptului că granulele își pierd ușor culoarea eozinofilă prin săruri de alcali. Diferențierea granulelor pseudoeozinofile de cele eozinofile se face cu ajutorul unor eozin-gliceride, care colorează numai granulele eozinofile nu și pe celelalte. În anumite stări patologice, pot fi întîlnite heterofile cu granule mici rotunde, de culoare violacee-închisă, sau pot fi prezente ambele tipuri de granulații (sub formă de fus și rotunde). Se pare că heterofilele cu granulații rotunde și mixte sînt de fapt forme intermediare de evoluție, decelabile în singele periferic în stările de suprasolicitare.

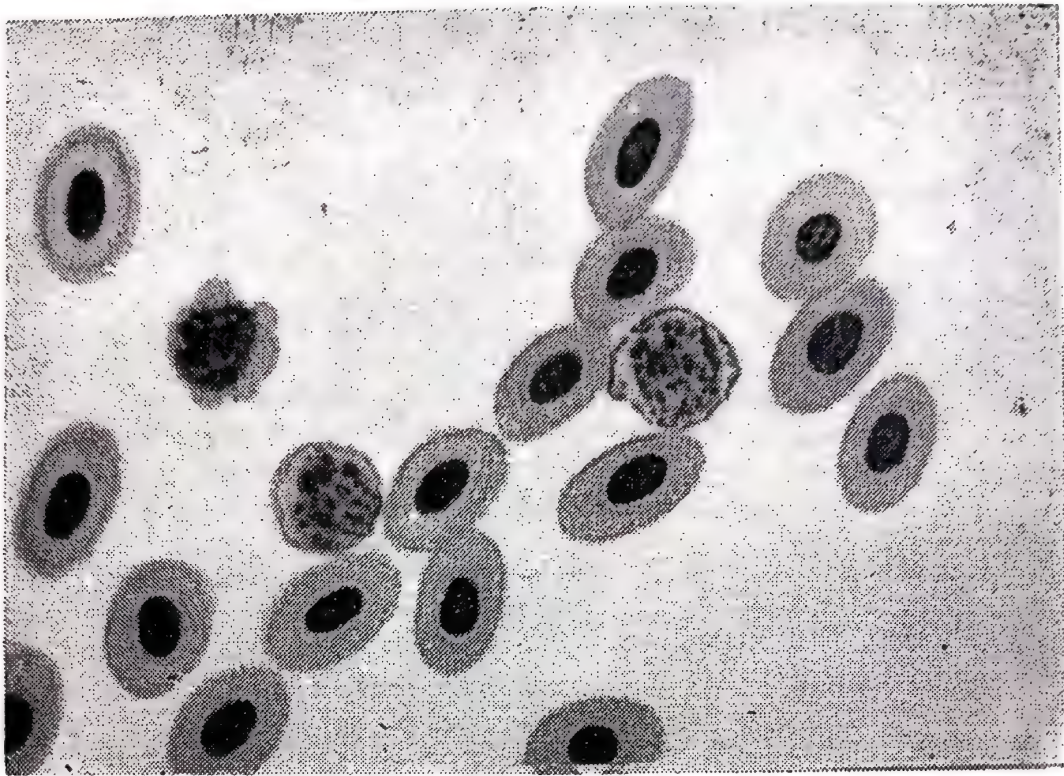


Fig. 137 — Singe de pasăre (limfocite mici)

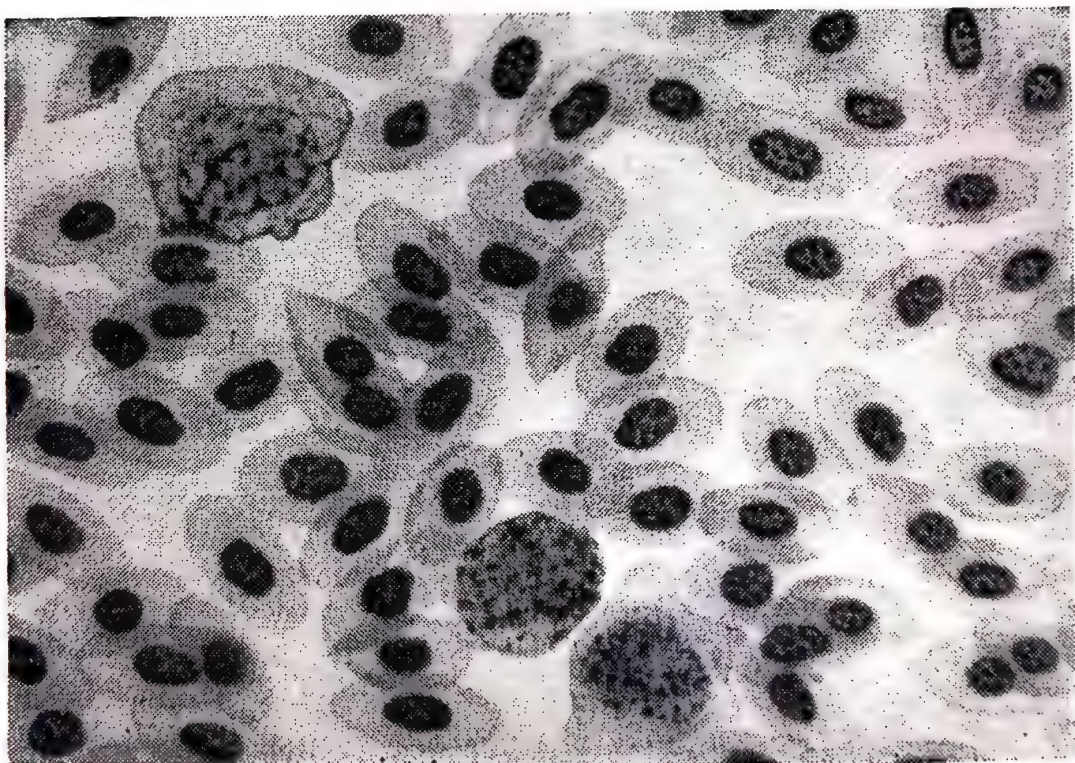


Fig. 138 — Singe de pasăre (limfocite mari)

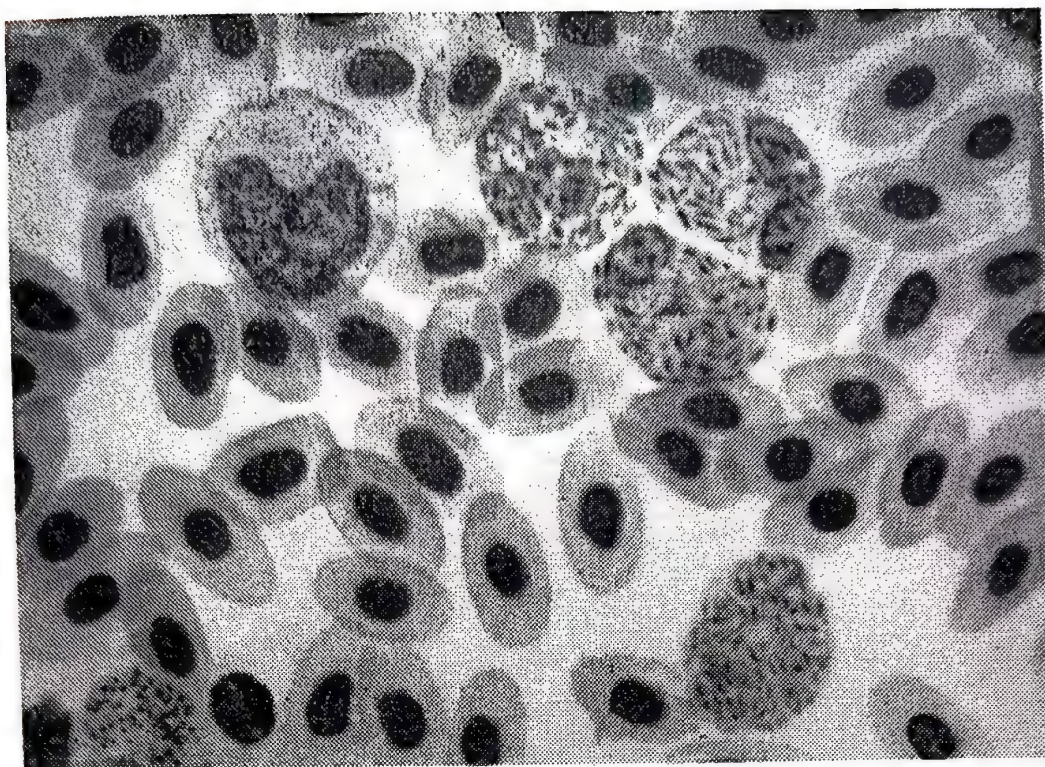


Fig. 139 — Sînge de pasăre (limfocite mari și heterofile)

Eozinofilul conține granule rotunde, uneori de mărimi variabile, de culoare oranj.

Bazofilul se caracterizează prin granule rotunde, uneori sub formă de bastonaș, colorate în albastru-închis, aproape negru.

Limfocitul predomină numeric celelalte elemente figurate albe (în medie 60%). Se deosebesc limfocite mari, cu diametrul de 11—18 microni și limfocite mici (4—10 microni) acestea fiind cele mai frecvente. Ele au un nucleu cu structură uneori grosolană, intens cromatic și o citoplasmă foarte îngustă. Limfocitele mari pot conține granule azurofile.

Monocitul. În legătură cu prezența acestei celule în sîngele păsărilor, există încă păreri contradictorii. Ținînd seama de faptul că păsările dispun de sistem reticulohistiocitar, se poate admite și existența monocitelor în sîngele normal. Diferențierea lor de limfocite este însă extrem de dificilă, încît cei mai mulți autori le încadrează în grupul limfocitelor.

Trebuie subliniat și faptul că pe frotiurile de sînge aviar se găsesc frecvent globule albe distruse (umbre), leucocite cu prelungiri amoeboide precum și alte celule greu de încadrat între eritrocite, celule fusiiforme (trombocite) sau limfocite mici, sistemul leucopoetic fiind foarte labil.

Trombocitele sînt celule nucleate, de formă oval-alungită, fusiformă, cu citoplasma colorată în albastru-murdar și nucleul violet-închis. Nucleul este mare, ocupînd uneori aproape întreaga celulă, situat central sau periferic. În citoplasmă, de obicei la unul din poli, se pot observa 1—3 corpusculi de cromatină ce pot fi legați între ei și cu nucleul prin punți cromatiniene. Trombocitele sînt dispersate în frotiu, neexistînd aspectul de „grămezi” ca la mamifere.

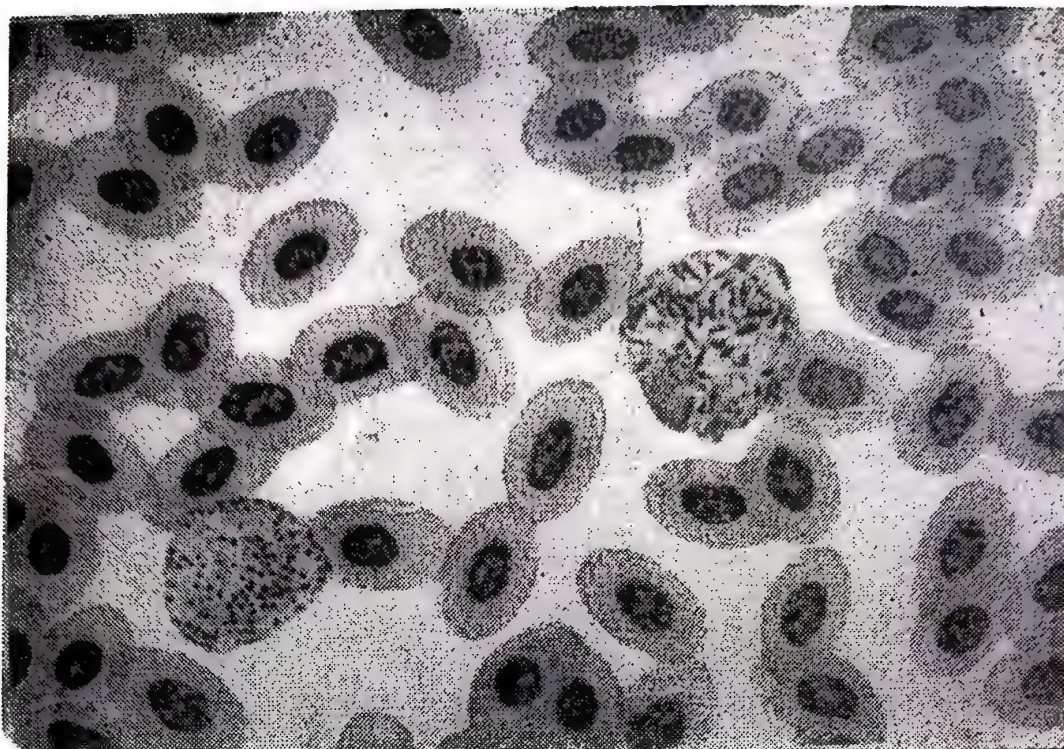


Fig. 140 — Singe de pasăre (heterofile cu granulații sferoide și în formă de bastonaș)

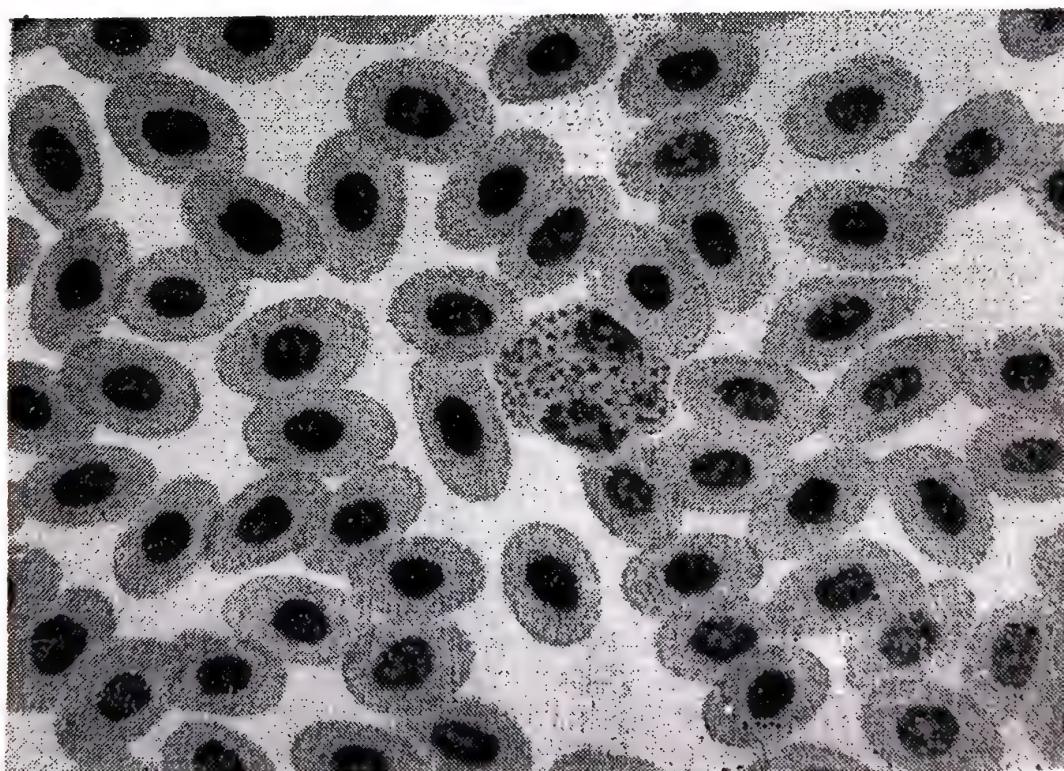


Fig. 141 — Singe de pasăre (eozinofil cu nucleu trilobat)

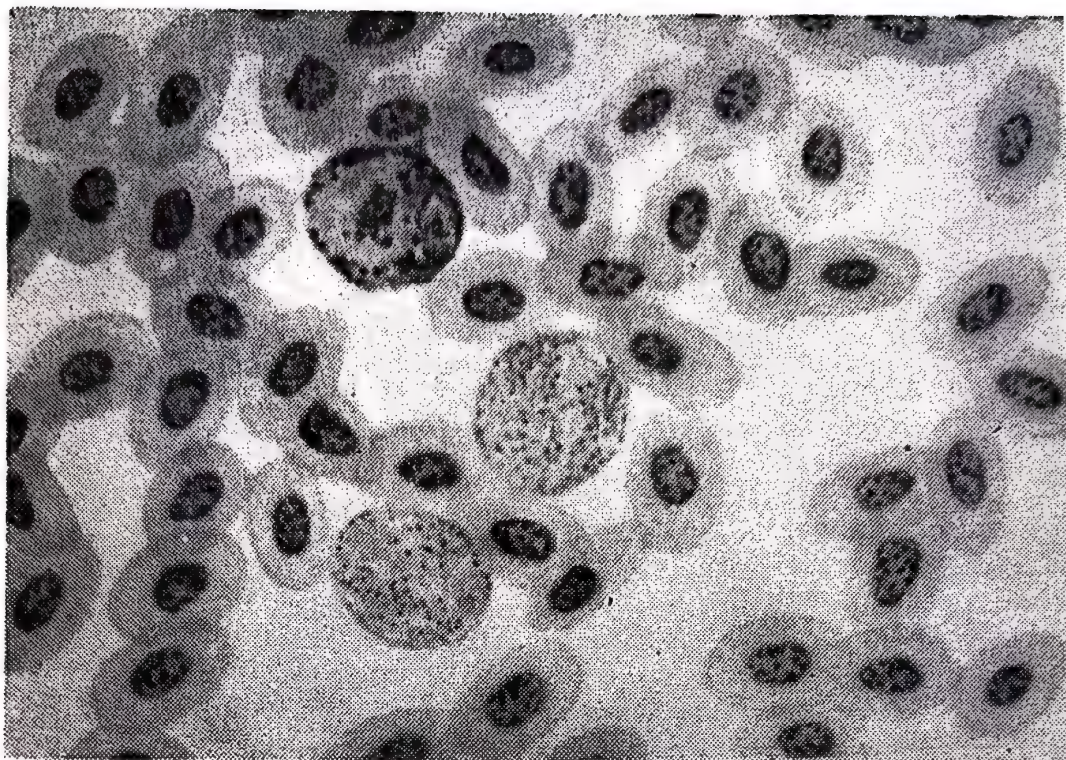


Fig. 142 — Sînge de pasăre (heterofile și bazofile)

În privința originii și rolului acestor celule fusiforme din sîngele păsărilor, există de asemenea păreri contradictorii. Unii autori consideră că ele ar fi de fapt eritrocite supramaturate, dehemoglobinizate, care au un rol minor în mecanismele de coagulare a sîngelui.

Citodiagnosticul

În cercetarea celulei, progrese considerabile au fost înregistrate în ultimele decenii datorită unor mijloace moderne de investigație, cum sînt citochimia, citoenzimologia, citoimunologia, citogenetica, microscopia electronică. Cu toate acestea microscopia optică clasică rămîne încă cea mai utilă în practica zilnică. Citodiagnosticul se bazează pe folosirea datelor furnizate de examenul unor celule existente în diferite țesuturi extrase prin puncție sau în diferite lichide de revărsare (exsudate sau transsudate) precum și în unele lichide naturale (lichidul cefalorahidian, urină, secreții nazale, lapte etc.) sau alte lichide patologice.

Existența în aceste lichide a unor elemente celulare reprezintă indicii deosebit de prețioase în caz de procese inflamatorii, procese septice, tumorale sau de altă natură. Dintre principalele metode utilizate în acest scop pot fi enunțate cîteva.

1 – Puncția medulo-osoasă

Vizează extragerea de măduvă osoasă, cu scopul de a stabili mielograma, respectiv structura citologică a acestui țesut. Locurile de elecție pentru puncția medulară sînt: sternul, unghiul extern iliac și ultimele 8 coaste. Primele două sînt cele mai larg folosite în medicina veterinară. Puncția se va efectua cu ace de puncție osoasă inoxidabile și sterile, avînd un diametru mai mare de 1—1,2 mm. Este preferabil ca acul să fie prevăzut cu un dispozitiv de oprire reglabil pentru adîncimi variabile. El trebuie, de asemenea, să poată fi adaptat la seringă. În cazul puncției sternale, după prealabila anestezie locală, prin infiltrație pînă la periost, cu novocaină 4—8% și după toaleta locală corespunzătoare, se face puncția straturilor cutanate pînă la periost în dreptul coastelor 2—4 și apoi se face reglarea adîncimii de 5—8 mm, după care se străpunge stratul cartilaginos, respectiv osos, preferabil printr-o mișcare de rotație ușoară. Odată acul pătruns în cavitatea osoasă se extrage mandrenul și se adaptează seringă sterilă și perfect uscată. Prin aspirație puternică, în seringă va apărea lichidul medular de culoare roșie (nu se scot mai mult de 0,2—0,3 ml). Se extrage brusc acul și se aplică un tampon cu tinctură de iod.

Conținutul seringii se trece rapid într-o sticlă de ceasornic sau pe o lamă. Din lichidul medular se fac froțiuni care, colorate prin metode

obișnuite (de exemplu May Grünwald-Giemsa), vor permite examinarea tipurilor de celule, întocmai ca în cazul frotiurilor din singe. La interpretarea datelor se va lua în considerație mai ales raportul dintre elementele seriei mieloide și eritroide ($\frac{M}{E}$) care exprimă coeficientul hematopoetic, cel mai important indice al activității medulare. Se vor cerceta 500—1000 elemente citologice. Coeficientul hematopoetic variază cu specia, vîrsta și starea fiziologică între anumite limite (la cal 0,94—3,76 la vacă 0,57—2,59). Mielograma se impune în toate bolile traduse prin anemii persistente, intermitente, remitente, în paracitemii, în boli hemoragipare (stahibotriotoxicoza, anemia purceilor, intoxicații micotice sau de altă natură). În filarioza avansată, de exemplu, se constată o scădere a elementelor mieloide și creșterea eritroidelor; în limfadenite mielograma se caracterizează prin reacție limfocitară, în anemia infecțioasă crește seria mieloidă în detrimentul celei eritroide; în anemiile aplastice (aregenerative) se constată prăbușirea eritropoezei; în anemiile hemolitice se produce o intensă proliferare a seriei eritroblastice, iar în diferite tipuri de leucoză se vor produce substanțiale modificări în seria elementelor albe, în sensul creșterii numărului acestora, corespunzător tipului de leucoză.

2 — Puncția ganglionară

În comparație cu mielograma, citograma limfoganglionară ocupă un loc modest în diagnosticul clinic, fapt datorat mai ales ușurinței cu care se poate efectua examenul histopatologic al ganglionilor, acesta furnizînd și avantajul că, păstrînd arhitectura tisulară normală, permite o mai fidelă interpretare a modificărilor celulare. Cînd se folosește totuși (este cazul unor suspiciuni de neoplasm al căror diagnostic este important) datele furnizate sînt foarte importante pentru aplicarea măsurilor corespunzătoare legate atît de individ, cît și de efectiv.

Puncția ganglionară este o operațiune simplă și expeditivă, efectuîndu-se cu ace prevăzute cu mandren, după prealabila toaletă locală. Extragerea de conținut tisular se face prin aspirare cu seringă, după care urmează etalarea pe lame de microscop, colorarea și examinarea.

De regulă, materialul obținut prin puncție nu ajunge pînă în seringă ci ocupă numai o parte din lumenul acului. Partea solidă a punctatului nu se pretează pentru etalare în bune condiții și din acest motiv se va utiliza partea fluidă.

Metoda are însă și unele dezavantaje: uneori fragmentele de țesut prin etalare suferă alterații mecanice, celulele fixe rezistă la aspirație, astfel încît frotiurile obținute nu redau întotdeauna cu fidelitate celularitatea ganglionară, uneori elementele importante pentru diagnostic pot scăpa observației mai ales datorită faptului că, spre deosebire de măduva osoasă, modificările patologice sînt dispuse în focare.

Metoda furnizează date utile în caz de adenopatii cum sînt:

— adenitele inflamatorii acute (se constată hiperplazie a elementelor limfoide în prima fază, urmată de proliferarea celulelor endoteliale macrofage, a celulelor reticulare precum și a seriei plasmocitare și bazofilelor);

— limfadenite purulente (se constată că țesutul limfoid este invadat de macrofage încărcate cu pigmenți și resturi celulare);

— limfadenite cronice nespecifice (fond limfoid, format în majoritate din elemente mature și rare celule reticulare, plasmocite, histiocite, mastocite);

— limfadenite specifice tuberculoase (în faza incipientă hiperplazie inflamatorie nespecifică, pentru ca apoi să se constituie o structură caracteristică: fond limfocitar, celule epiteloid, gigante și mase necrotice; lipsa granulocitelor după unii, ar fi caracteristică);

— adenopatiile alergice (proliferare limforeticulară și hiperplazie intensă eozinofilică; spre deosebire de limfadenitele banale, nu sînt proliferate plasmocitele, iar semnele de fagocitoză lipsesc);

— limfadenopatiile tumorale (proliferarea diferitelor tipuri celulare, în funcție de natura procesului tumoral — reticulosarcoame, limfosarcoame, limfogranulomatoză, metastazele carcinomatoase etc.).

3 – Examenul lichidelor de revărsare patologice

Cu toate că diagnosticul citologic al revărsatelor a fost inițiat de aproape un secol, metoda rămîne încă dificilă, posibilitățile de eroare fiind mai mari decît în alte domenii ale citologiei. Cauza principală rezidă în greutatea de a delimita elementele mezoteliale normale, degenerate sau atipizate secundar, de celulele maligne.

Obținerea lichidelor patologice de revărsare se face prin puncție exploratoare. Ea se practică cu ace de seringă sau trocare speciale cu care se face extragerea acestor lichide de la nivelul unor cavități preformate (peritoneală, pericardică, articulară) sau de la nivelul unor organe (hematoame, abcese, chiști de diferite naturi etc.). Citodiagnosticul se face utilizînd sedimentul de repaus sau cel obținut prin centrifugare. Examinarea se execută pe preparate native (direct) sau pe frotiuri care se colorează după tehnici corespunzătoare. Celula specifică a revărsatelor este celula mezotelială. La aceasta se pot adăuga elemente reticulo-histocitare, elemente sanguine și celule tumorale.

Transsudatele sînt lichide ce apar consecutiv filtrării componentelor sîngelui prin peretele vascular fizic intact și se caracterizează printr-o masă specifică sub 1015, iar conținutul proteic este sub 2,5%. Conținutul celular al acestor lichide este redus (sub 200—300 elemente/mm³). Dintre acestea circa două treimi sînt elemente mezoteliale, o treime limfocite și circa 5% granulocite, la care se adaugă și rare hematii. În transsudatele vechi elementele mezoteliale cresc numeric și volumetric, apărînd și forme degenerative sau atipice, cu hipercromazie, deformări nucleare, celule balonizate, la care se adaugă celule în mitoză, astfel că elementele pot simula la prima vedere celule tumorale.

Exsudatele se datoresc acumulării active de lichid în cavitățile seroase, asociată cu lezarea pereților capilarelor. Ele au un conținut proteic de peste 2,5%, o masă specifică peste 1015, cu o cantitate mare de fibrină, ce determină o coagulabilitate ridicată, uneori instantanee, în momentul extragerii și al contactului cu atmosfera. În aceste lichide, se constată și o abundență celulară peste 500—1500 elemente/mm³, constituită din polimorfonucleare neutrofile, la care se adaugă un număr redus de elemente

mezoteliale și limfocite. În perioada de convalescență, limfocitele și celulele mezoteliale cresc numeric, iar neutrofilele scad, concomitent apărând forme degenerative, iar în celulele mezoteliale se produc vacuole, cromatina își pierde finețea, transformându-se în mase grosiere. În ultima fază, apare procesul de fagocitare a granulocitelor degenerate de către celulele mezoteliale și histiocitare.

Exsudatele inflamatorii cronice au tabloul citologic aproape în întregime ocupat de limfocite.

În procesele septice, alături de o masă celulară abundentă se constată și prezența unei flore bacteriene bogate, cu fenomene de fagocitoză ale acesteia bine reprezentate.

În procesele neoplazice se vor găsi celule monstruoase, cu 1—2 nucleu hiperchromici pe cale de diviziune. Aceste elemente sînt dispuse în ghemuri, așa că nu apar la microscop ca celule epiteliale, într-un singur plan. În leucemia limfoidă, ca și în inflamațiile specifice (tbc) este prezentă o limfocitoză marcată.

În cazul altor lichide de puncție componența celulară este variabilă cu natura lichidului:

— în cazul lichidului hidroamniotic apar celule epiteliale de dimensiuni mari;

— în lichidul chistic ovarian apar elemente figurate sanguine și celule epiteliale cilindrice;

— în lichidul echinococic se pot descoperi porțiuni din membrana chistului hidatic, alături de scolecși (examinarea se face pe preparatul proaspăt și necolorat);

— în cazul lichidului peritoneal de natură hidronefrotică se constată, alături de celulele care constituie epiteliul tubilor renali, și cristale de uree și de acid uric;

— în lichidul de puncție articulară — în caz de inflamații acute — se constată o abundență de polinucleare neutrofile și fibrină; în artritele tuberculoase predomină limfocitele;

— în lichidul de puncție testiculară (în caz de hidrocel) alături de celulele caracteristice procesului inflamator, se găsesc în număr variabil, și celule endoteliale și spermatice; în orhitele acute de natură brucelică se constată o predominanță a mononuclearelor.

4 – Examenul citologic al lichidului cefalorahidian

Cunoașterea citologiei lichidului cefalorahidian are o valoare deosebită pentru stabilirea diagnosticului într-o serie de întreagă de boli, în care sînt afectate meningele și encefalul. Studiul structurii celulare a acestuia reprezintă o adevărată „biopsie” a meningelui, după cum afirmă *Ramon* și valorează, uneori, cît un examen histopatologic al acestuia.

Pentru obținerea lichidului cefalorahidian se recurge la puncția rahidiană și, foarte rar, la puncția ventriculilor laterali. Puncția rahidiană poate fi practică la înălțimi variabile (occipito-atloidiană, cervicală atloaxoidiană, lombară și sacro-codală).

Deși la animale nu sînt stabilite încă exact, la toate speciile variațiile normale și patologice ale citorahiei, examenul lichidului cefalorahidian este de cea mai mare importanță pentru diagnosticul clinic al bolii-

lor cu manifestări nervoase. Examenul se poate executa fie direct din lichid, fie din depozitul de centrifugare sau de sedimentare. Colorarea elementelor celulare se face cu violet de metil 0,20%, prin metoda May Grünwald-Giemsa sau cu o soluție de cristal violet 1%. În cazurile patologice și mai puțin în cazurile normale, sedimentul poate să dea o valoare relativă a numărului de elemente și date despre originea lor.

Pentru stabilirea numărului de elemente celulare se recoltează lichidul cefalorahidian, se pune într-o eprubetă și se adaugă câte o picătură de violet de metil sau de cristal violet, la fiecare mililitru lichid, omogenizându-se. Apoi cu o pipetă Pasteur se va pune o picătură pe unul din șanțurile laterale ale unei camere de numărat de tip Nageotte sau alt tip și, după o sedimentare de 10—15 minute, se examinează la microscop, procedându-se întocmai ca la hematimetrie, cu mențiunea că nu se mai fac calculele respective. O apreciere aproximativă se poate face și prin cercetarea a 5—6 câmpuri microscopice din preparatele făcute din sediment.

Creșterea numărului de elemente albe și în multe cazuri și a elementelor roșii (pleiocitoza) se întâlnește în toate reacțiile meningiene de origine toxică, toxiinfecțioasă și microbiană și mai rar în reacții tumorale meningiene.

Elementele întâlnite în lichidul cefalorahidian în stări patologice sînt diferite. În afară de limfocitele mari și mici, care se întîlnesc și în stare normală, alături de rare elemente endoteliale — denumite pentru forma lor și „celule cu coadă” — se vor întîlni și alte tipuri de celule:

- neutrofile polinucleare — expresie a infecțiilor microbiene;
- limfocite, exprimînd neuroviroze și intoxicații;
- în listerioză și cenuroză la rumegătoarele mari și mici — pe lângă o pleiocitoză de tip limfocitar se găsesc și niște formațiuni sub forma unor aglomerări celulare de aspect neuniform, formate din endoteliul subarahnoidian; ele corespund mai ales stărilor întovărășite de edem cerebral;
- în meningoencefalite microbiene (listeriene) numărul elementelor albe poate să depășească 300—400 elemente pe mm^3 ; pleiocitoza se întîlnește și în: febra catarală malignă, durină, turbare, jigodie, boala de Teschen.

5 – Examenul citologic al sedimentului urinar

Examinarea microscopică a sedimentului urinar este de o deosebită importanță pentru precizarea diagnosticului, mai ales în bolile aparatului excretor renal.

În acest scop, se va folosi urina proaspăt recoltată prin cateterism sau prin emisiune provocată. În ambele situații, se va lua, pentru examenul citologic, urina din ultima parte a recoltării. Dacă examenul nu se poate face imediat, se poate recurge la conservarea urinei la temperaturi joase (+4 +6°C) eventual cu un adaos de antibiotice, pentru a evita dezvoltarea florei microbiene, generatoare de fermentații și procese chimice, al căror rezultat este modificarea tabloului cito-microscopic al urinei.

Pentru obținerea sedimentului urinar, se va recurge la conservarea urinei în pahare conice cu picior, ori se va face filtrarea sau centrifuga-

rea. Sedimentarea în repaus se obține după câteva ore, după specie (2—3 ore la rumegătoare, 12—15 ore la cal). La cal urina are, în mod normal, un abundant sediment mucos, care jenează mult examenul. Pentru îndepărtarea acestui sediment (nubecula) se indică adăugarea câtorva picături de amoniac, clorură de calciu sau administrarea prealabilă de carbonat de sodiu. Urina primește un aspect tulbure, ceea ce impune o filtrare. Sedimentul obținut pe filtru se recuperează prin spălare cu apă acidulată, după care se poate cerceta prin mijloacele obișnuite.

În cazul centrifugării este bine ca analiza sedimentului să se facă sub formă de fracțiuni, mai ales la animalele în a căror urină se găsesc mari cantități de săruri minerale (erbivore). Prima centrifugare se face pe o durată scurtă (30—60 secunde), după care aceeași urină se pune în altă fiolă de centrifugare și se supune la 3000 turații/minut, timp de 20—30 minute.

Examenul sedimentului se poate face între lamă și lamelă fără nici o colorație prealabilă, sau după colorare. Pentru examenul sedimentului colorat se poate folosi o soluție de formol 10%, la care s-au adăugat 2 g% albastru de metilen. Din această soluție colorantă (sol. Liebman), se pun 4—5 picături peste sediment și se omogenizează cu o pipetă Pasteur. Se spală de 2—3 ori cu ser fiziologic, centrifugându-se de fiecare

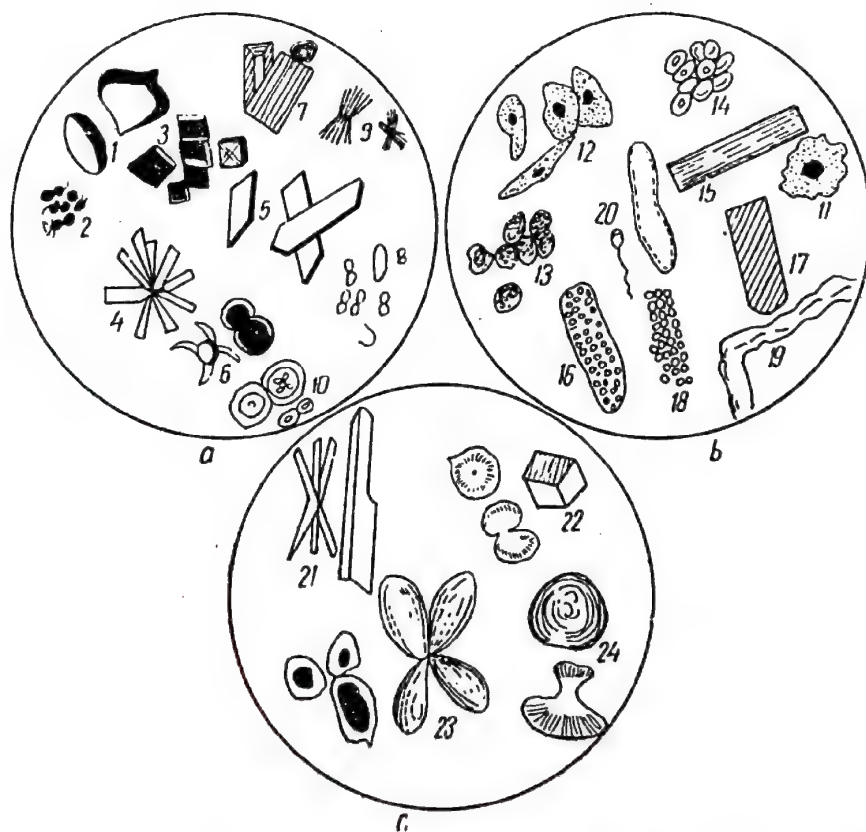


Fig. 143 — Examenul microscopic al urinei

a — sediment neorganizat (1 — acid uric, 2 — urat de sodiu, 3 — oxalat de calciu, 4 — fosfați de calciu, 5 — acid hipuric, 6 — urat de amoniu, 7 — tartrat amoniaco-magnezian, 8 — carbonat de calciu, 9 — tirozină, 10 — leucină); b — sediment organizat (11 — epiteliile vaginale și vezicale, 12 — epiteliile din bazinet, 13 — leucocite, 14 — hematii, 15 — cilindri hialini, 16 — cilindrii granuloși, 17 — cilindrii ceroși, 18 — cilindrii grășoși, 19 — cilindroizi, 20 — spermatozoizi); c — sediment de cristale de sulfamide (21 — cristale de sulfanilamidă, 22 — cristale de sulfatiazol, 23 — cristale de sulfapiridină, 24 — cristale de sulfadiazină)

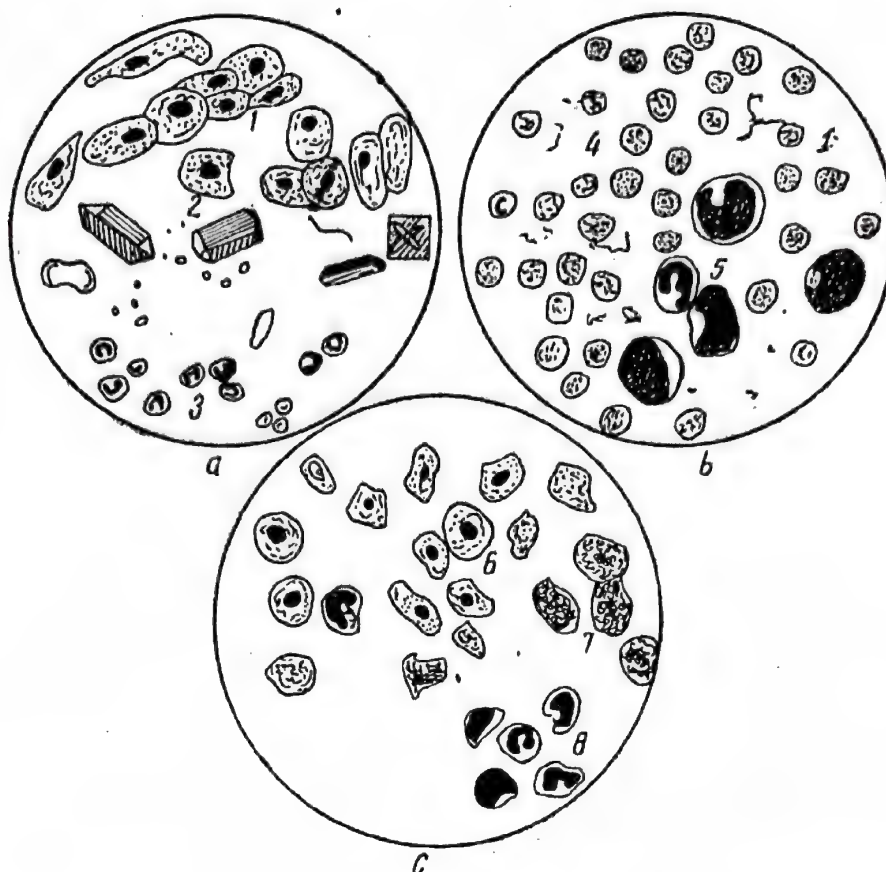


Fig. 144 — Examenul citologic al urinei

a — sediment urinar în cistita acută (1 — epiteliu plat din stratul superficial, 2 — celulă epitelială izolată, 3 — granulocite neutrofile); b — sediment în pielonefrită (4 — hematii, 5 — leucocite); c — sediment în nefrita acută (6 — epiteliu renal alterat, 7 — celule mari cu nucleu puțin vizibili, 8 — leucocite)

dată, iar ultimul sediment se examinează între lamă și lamelă. Se poate recurge și la colorarea direct pe lamă, adăugându-se peste sediment un număr egal de picături de colorant și acoperind totul cu o lamelă. Nucleii celulelor și bacteriile vor apărea colorate intens, cilindrii ceroși iau o culoare albastră-închisă; cilindrii hialini iau o culoare albastră-deschisă iar hematiile apar albastre-cenușii. Se poate recurge și la alte metode de colorare (cu soluție Lugol, cu albastru de tripan, roșu de Congo etc.).

Din punct de vedere citologic, în urină pot fi decelate în mod normal elemente celulare epiteliale, provenite din descuamarea epiteliului căilor urinare. În cazuri patologice, apar celule al căror aspect diferă după etajul segmentului genito-urinar din care s-au desprins. Pe baza lor se poate diagnostica caracterul și chiar nivelul leziunilor.

Celulele epiteliale renale apar de formă rotundă sau poliedrică, cu un nucleu mic strălucitor, bine conturat. Citoplasma, în majoritatea cazurilor, apare granulară din cauza proceselor degenerative. În general, citoplasma celulelor epiteliale ale tubilor contorți are aspectul granular, iar cea a celulelor ramurii descendente Henle are aspect clar. Celulele epiteliului renal propriu-zis sînt de cele mai multe ori solitare, rareori sub formă de grămezi. Prezența acestor celule renale indică procese inflamatorii acute (tubulonefrite, pielonefrite, congestii renale, infarcte hemoragice renale).

Celulele epiteliale ale conductelor urinare pot fi de trei feluri:

a) celule mari, late, poligonale, cu unghiuri multiple, cu nucleu mic, slab colorat sau clar, lipite mai multe la un loc, sub formă de placarde. De obicei, apar abundente în cursul congestiei tractusului urinar (vezica și uretra). Ele sînt de obicei în stratul superficial al sedimentului;

b) celule alungite, asimetrice, inegale la cele două extremități, apărînd de cele mai multe ori sub formă de rachetă, de fus sau de măciucă, cu un nucleu mic, însă bine evidențiat, așezat întotdeauna în partea cea mai voluminoasă a celulei. Aceste celule sînt în stratul mijlociu al sedimentului;

c) celule de dimensiuni mici, rotunde sau ovale, cu nucleu mic și evident. Toate aceste tipuri de celule caracterizează stările catarale.

Leucocitele apar de cele mai multe ori sub formă de granulocite polinucleare. Dacă se adaugă sedimentului cîteva picături de hidrat de potasiu, nucleii acestor celule devin mai ușor colorabili (în mediul alcalin ele se tumefiază). Piuria arată un catar al căilor urinare, pielită, pielonefrită, abcese renale, nefrite purulente, uretrite și mult mai rar nefroze.

Hematiile apar numai în cazuri patologice, rareori, și numai la unele specii (cățea, pisică), în anumite momente ale ciclului sexual normal. Hematuria poate fi macroscopică (vizibilă prin aprecierea culorii și a sedimentului) sau microscopică, observabilă numai după centrifugare sau sedimentare îndelungată (microhematurie). La examenul microscopic, hematiile apar solitare sau grupate sub formă de cilindri hematici și cheaguri. Hematuria se semnalează în congestii, infarct renal, nefroze necrotice în unele nefrite cronice, cistita cronică a rumegătoarelor, tumori vezicale, bolile hemoragipare, antrax, intoxicații cu plante toxice, rujet, pestă porcină.

Cilindrii urinari apar ca mîlaje sau tipare ale canalelor urinare superioare, ale tubilor uriniferi avînd o formă alungită, cilindrică, cu extremitățile de aspect variabil: drepte, spintecate, neregulate. Formarea lor are ca substrat desprinderea epiteliiilor tubilor urinari și legarea lor în conglomerate prin produsele de exsudație și mai ales prin fibrină. După structura lor cilindrii urinari pot fi:

a) *cilindrii epiteliali* apar ca formațiuni arcuite, uneori spiralate sau chiar ramificate, în care celulele componente au delimitări nete și toate însușirile epiteliului tubular renal (protoplasmă abundentă și nucleu de dimensiuni reduse). Alteori, celulele componente au contururi abia vizibile, datorită proceselor degenerative care s-au instalat. Prezența lor denotă tulburări congestive renale precum și procese degenerative în prima fază, sau nefrite acute interstițiale, pielonefrite și mai rar nefrite cronice;

b) *cilindrii granuloși* sînt întîlniți mai des în urina carnasierelor. Ei au aceeași origine ca și precedenții, doar că, datorită fenomenelor de degenerescență granulară a celulelor, apar ca formațiuni scurte, mai groase, drepte sau încurbate. Contururile celulare sînt de obicei șterse. Se întîlnesc în inflamațiile acute și cronice ale rinichiului, în degenerescența granuloasă și amiloidă a acestuia;

c) *cilindrii hialini* rezultă fie din coagularea albuminei exsudate, fie din degenerarea hialină a cilindrilor epiteliali. Ei apar ca formațiuni transparente, incolore, cu contur net, cu structură omogenă. Se evidențiază mai bine după colorare cu soluție Lugol. Se întîlnesc în toate infla-

mațiile rinichiului, în staze renale, uneori în cursul albuminuriei de natură toxică. Ei nu au o semnificație patologică, dacă nu coexistă cu alte elemente ale stărilor respective (celule epiteliale, leucocite, hematii, cilindri etc.);

d) *cilindrii ceroși* sînt asemănători cu cei hialini, dar au o refringentă caracteristică și o colorație gălbuie. Se diferențiază de cilindrii hialini prin aceea că nu dau reacția amiloidului cu soluția Lugol, precum și prin rezistența față de soluțiile acide. Cu acidul osmic se colorează în brun. Prezența lor indică o nefrită cronică, parenchimatoasă, nefroza grasă;

e) *cilindrii grăsoși* sînt alcătuiți din celulele tubilor contorți, care au suferit fenomene de degenerescență grasă (în intoxicații cu Pb, As sau în unele nefrite cronice). Au un contur clar și în masa lor se disting picături sau cristale de acizi grași. Se colorează în negru cu acid osmic și în roșu cu Sudan III. Se întîlnesc în urina carnasierelor și mai ales a felineilor și niciodată în aceea a erbivorelor;

f) *cilindrii leucocitari* sau purulenți sînt asemănători celor epiteliali cu singura diferență că sînt formați din elemente leucocitare îngrămădite. Ei se pot forma de fapt și prin infiltrarea cu elemente albe a unor cilindri de altă natură. Prezența lor indică nefrita purulentă, pielonefrite, pielite. Se întîlnesc mai frecvent în urina rumegătoarelor mari la care se semnalează mai des aceste stări. Ei au o semnificație prognostică gravă;

g) *cilindrii hematici și hemoragici* reprezintă conglomerate de globule roșii, între care se pot găsi rare leucocite. Au o culoare glabenă-deschisă pînă la galbenă-brună, dimensiuni reduse (sînt mici și scurți) și denotă congestii renale, infarcte hemoragice, nefroze și nefrite în faze incipiente;

h) *cilindrii hemoglobinici* rezultă din degenerarea cilindrilor hematici, sau impregnarea cu hemoglobină a cilindrilor hialini. Au o culoare verde-gălbuie, pînă la brună și au dimensiuni reduse. Semnificația lor patologică este aceeași ca a celor hematici;

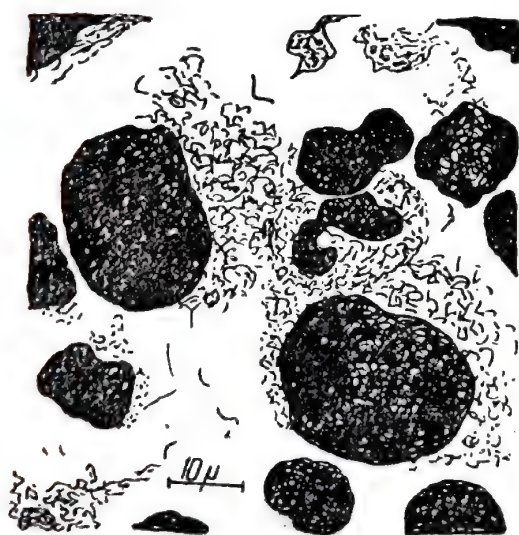


Fig. 145 — Aspect citologic în inflamații ale seroaselor (mezotelii tinere)



Fig. 146 — Aspectul citologic în pleurezia tuberculoasă incipientă (mezotelii tinere și polinucleare neutrofile)

i) *cilindrii biliari* apar ca niște grămezi de culoare glabenă-deschis, pînă la brunie. Prin reacția Gmelin cu acid azotic se colorează diferit — roșu, violet, albastrui sau verde;

k) *cilindrii bacterieni* apar mai ales la rumegătoare mari în cursul pielonefritei și sînt constituiți din grămezi de bacterii (mai ales *Corynebacterium bovis*).

În afară de aceștia, în sedimentul urinar se mai pot constata:

— *detritusuri celulare* care provin din descompunerea elementelor citologice ce se desprind de la nivelul rinichiului și al căilor urinare și sînt mai abundente în inflamații ale aparatului urogenital;

— *spermatozoizii* care se găsesc mai rar la animalele mari și mai frecvent la cîine, mai ales după stările asfixice, accese epileptiforme sau excitații genezice;

— *celulele tumorale* care se găsesc în caz de neoplasme ale sectorului urogenital.

De asemenea, în sedimentul urinar se pot găsi și diferiți paraziți: *Filaria haemorrhagica* la erbivore, *Dirofilaria imitis* la cîine, ouă de strongili (*Diectophyme renale*) la cal, carnasiere, coccidii la găște, *Schistosoma* la rumegătoarele mari, *Stephanurus* la porc, *Trichomonas* etc.

Metode de examinare a micoplasmelor și infecțiilor micoplasmice

Micoplasmele sînt microorganisme care trec prin filtrele Seitz, EK, Chamberland L₁ și L₂ (nu și prin L₃), greu colorabile prin metode obișnuite, care provoacă o serie de procese patologice la diferite specii de animale.

Cele mai importante specii izolate de la animale sînt arătate în tabelul 8.

Tabelul 8

Principalele specii de micoplasme izolate de la animale

Gazda	Specia de micoplasme	Sediul în organism sau infecția din care se izolează
Taurine	<i>M. mycoides</i>	Peripneumonia contagioasă
	<i>M. bovigenitalium</i>	Stări de infecunditate
	<i>M. bovirhinis</i>	Mamite, pneumonii, epifit al căilor respiratorii
	<i>M. laidlawi</i>	Secreții genitale, respiratorii
Ovine caprine	<i>M. agalactiae</i>	Agalaxia contagioasă
	<i>M. mycoides</i> var. <i>caprae</i>	Pleuropneumonia contagioasă a caprelor
Suine	<i>M. hyorhinis</i>	Poliartrite
	<i>M. granularum</i>	Artrite
	<i>M. hyopneumoniae</i>	Pneumonia enzootică
	<i>M. hyogenitalium</i>	Mamite
	<i>M. hyoarthrinosa</i>	Artrite
Păsări	<i>M. gallisepticum</i>	Micoplasmoza respiratorie aviară
	<i>M. gallinarum</i>	Epifit al căilor respiratorii
	<i>M. meleagridis</i>	Aerosaculita curcilor
	<i>M. sinoviae</i>	Polisinovita infecțioasă
Canine	<i>M. spumans</i>	Infecții secundare în jigodie
	<i>M. canis</i>	Idem
	<i>M. maculosum</i>	Idem
Șoareci Șobolani	<i>M. pulmonis</i>	Pneumonia enzootică a murinelor
	<i>M. neurolyticum</i>	Infecția sistemului nervos la șoareci
	<i>M. arthritidis</i>	Artrite la șobolani

În examinarea micoplasmelor se folosesc o serie de metode de laborator, dintre care cele mai importante sînt descrise mai departe.

1 – Examenul microscopic

Are o valoare semnificativă în special pentru cercetarea caracterelor morfologice în culturi, deoarece punerea în evidență a germenilor din produsele patologice este dificilă și nu oferă date importante pentru diagnostic.

Principalele metode ce se folosesc pentru colorarea frotiurilor sînt metoda Giemsa și Wroblewski.

Metoda Giemsa — se acoperă frotiul cu soluția Giemsa diluată (3 picături soluție Giemsa concentrată la 2 ml apă bidistilată) și se ține 30—60 minute.

— se varsă colorantul și se spală cu apă distilată.

Metoda Wroblewski — frotiurile se fixează în vapori de acid osmic, după care

— se face mordansarea timp de 10 minute într-o soluție compusă din:

- tanin 2,0 g
- sulfat de zinc 1,0 g
- apă distilată 100,0 ml

— spălare intensă cu apă

— colorare timp de 3—5 minute cu soluție de fucsină Ziehl.

Micoplasmele se colorează și prin metoda Gram-dublu apărînd Gram negative. Din punct de vedere morfologic, ele apar ca niște formațiuni cocoide, foarte mici (0,3—0,6 microni) colorate în roșu, de aspect polimorf (sferoide, inelare, romboidale sau filamentose). Polimorfismul cel mai pronunțat apare în frotiuri din medii lichide.

În culturile mai vechi, formele filamentose dispar, în frotiuri predominînd formele cocoide. Prin supracolorare, în culturi proaspete se pot pune în evidență și formațiuni globuloase, mari, amintind celula unor drojdii.

2 – Examenul cultural

Cultivarea micoplasmelor este destul de dificilă, dacă nu se îndeplinesc anumite exigențe care să permită dezvoltarea pe mediile de cultură artificiale. Bune rezultate se obțin prin folosirea următoarelor medii:

Mediul Edward compus din:

- bulion de cord de bou 1 000,0 ml
- acetat de talii 0,5 g

În momentul întrebuițării se adaugă 100 U.I. penicilină la 1 ml mediu și 20% ser de cal normal. Adăugarea în proporție de 2% a agarului permite obținerea unui mediu solid.

Mediul Riegler-Stamatin

- fibre de agar 0,5 g
- bulion 100,0 ml
- ser de cal sau bou 10,0 ml

pH-ul mediului se ajustează la 7,7

Mediul Newing

- extract de carne de bou 2,0
- peptonă 10,0 g
- ser de cal sau bou 10,0 ml
- extract de drojdie 10,0 g
- glucoză 0,1 g
- apă distilată 100,0 ml

pH-ul se ajustează la 7,4

Sterilizarea are loc prin filtrare direct în vasele de cultivare; pentru a înlătura contaminările, se poate adăuga acetat de talu și penicilină.

Bulionul infuzie-cord se prepară din 453 g cord de cal sau bou, fragmentat și pus la macerat la rece, peste noapte, într-un litru de apă. Se ține sub vapori de apă 2 ore, se ajustează pH-ul la 8,4, se filtrează, se reajustează pH-ul la 7,8, după care se adaugă 10,0 g peptonă, 5,0 g extract de carne, 5,0 g mucină gastrică de porc, 5,0 g NaCl și se aduce volumul la 1 litru. Apoi se autoclavează și se repartizează, în flacoane sau tuburi, în cantități convenabile.

Agarul infuzie-cord se prepară din bulionul infuzie de cord, la care se adaugă 20,0 g agar. Se ajustează pH-ul la 7,6 și se filtrează la cald (în autoclavul cu capacul deschis). Pentru laboratoarele mici este bine să se repartizeze în cantități mici de 16 ml în tuburi cu dop înșurubat. Înainte de folosire se adaugă 20% ser de cal și 10% extract de drojdie (după ce agarul a fost topit și răcit la 50°C).

Bulionul PPLO Difco este identic cu bulionul infuzie de cord, doar că se adaugă 20% ser de cal (sau alt ser) inactivat. Pentru a fi selectiv se poate adăuga 300 U.I./ml penicilină și acetat de talu în proporție finală de 1/4000.

Mediul White se folosește în special pentru izolarea din materialele contaminate. Se compune din:

- bulion de carne 1 000,0 ml
- ser normal de cal sau bou 100,0 ml
- acetat de talu 1,0 g
- sulfametazină 0,20 g
- cristal violet 0,001 g

pH-ul se ajustează la 7,6—7,8

Temperatura optimă de dezvoltare este de 36—38°C timp de 2—10 zile.

Se însămânțează în mod obișnuit atât medii lichide cât și solide. Incubația se face timp de 3—7 zile la 37°C. Unele tulpini se dezvoltă mai bine în exicator.

Aspectul cultural este, în general, similar pentru toate speciile, variațiile semnalându-se în special în legătură cu condițiile de cultivare.

În mediile lichide, micoplasmele produc o turbiditate discretă, deceleabilă în special dacă se compară cu un mediu neînsămîntat. Controlul dezvoltării se face mai ușor dacă se adaugă mediului glucoză și un indicator de pH (dacă se folosește roșu fenol dezvoltarea este indicată de virarea culorii spre galben).

Pe mediile solide, pentru o mai bună observare a aspectelor culturale, se recurge la examinarea coloniilor la microscop, cu un obiectiv mic sau la lupă. Se pot distinge, în acest fel, 3 tipuri de colonii:

— colonii de tip T (thin), mici, cu diametrul de 10—20 microni, ușor bombate, rotunde, dense;

— colonii mijlocii, bombate, cu centrul granular și o zonă marginală îngustă, abia vizibilă; după 6 zile de incubație pot atinge dimensiunile de 100 microni diametru;

— colonii butonate, mamelonate mari, formate din două zone distincte, una centrală, opacă, densă și alta marginală, transparentă.

Coloniile sînt foarte aderente la mediu. Dacă se încearcă raclarea cu ansa, centrul coloniei rămîne inclus în mediu.

Aspectul morfologic al coloniilor se poate examina și prin:

— *examinare la microscopul cu contrast de fază*. În acest scop se secționează un strat foarte subțire de agar, cu colonia de examinat (cu ajutorul unei lame de ras), se pune pe lamă, se acoperă și se presează ușor cu o lamelă și se examinează cu obiectivul 60. Examinarea în acest fel relevă structura fin granulată a coloniilor;

— *colorarea cu acridin oranj*. În acest scop se scoate un strat de agar cu colonii caracteristice (cca 1 cm²) și se așază pe o lamă cu partea pe care se găsesc coloniile lipită pe lamă. Lama se introduce apoi în poziție înclinată (45°) într-un pahar cu apă la 80°C și se ridică brusc temperatura pînă aproape de fierbere. După topirea agarului, lama se spală ușor cu apă distilată. Coloniile se colorează apoi timp de 5 minute cu o soluție 0,1% acridin oranj.

La examenul microscopic, în lumina ultravioletă, coloniile prezintă o fluorescență roșie-strălucitoare;

— *colorarea prin metoda Dienes*. În acest scop, blocul cu agar cu coloniile suspecte se așază pe o lamă de microscop și se colorează timp de 2 minute cu o soluție compusă din:

— albastru de metilen	2,5 g
— Azur II	1,25 g
— maltoză	10,0 g
— carbonat de sodiu	0,25 g
— acid benzoic	0,2 g
— apă distilată ad	100,0 ml

Urmează spălarea cu apă, uscarea și examinarea.

Stabilirea apartenenței de specie se face prin corelarea cu specia de la care micoplasmele respective au fost izolate și prin efectuarea unor teste de tipizare.

3 – Examene biochimice

Oferă date utile pentru unele specii. Astfel spectrul zaharolitic este diferit în funcție de specie:

— *M. mycoides*: fermentează glucoza, maltoza, manoză, fructoza,

dextroza și amidonul și în măsură redusă, cu acidifiere în cazul galactozei, xilozei, zaharozei, trehalozei; alte hidrocarbonate nu sînt scindate;

- *M. bovigentalium*: nu fermentează hidrocarbonatele uzuale;
- *M. agalactiae*: fermentează lactoza, manita, eritrita;
- *M. mycoides* var. *caprae*: fermentează glucoza, zaharoza, maltoza, manoză, dextrina, glicogenul, nu fermentează galactoză, lactoză, salicina, manitolul, dulcitolul;
- *M. hyorhinis*: fermentează lactoză, zaharoza, glucoza, manita, maltoza;
- *M. gallisepticum*: fermentează dextroza, maltoza, galactoză, trehaloză, levuloză, manoză, dextrina, amidonul, xiloza; fermentează slab zaharoza și manitolul și nu fermentează lactoză, dulcitolul și salicina;
- *M. gallinarum*: nu fermentează hidrații de carbon uzuali;
- *M. sinoviae*: fermentează dextroza și maltoza, nu fermentează lactoză, zaharoza, manitolul;
- *M. meleagridis*: nu fermentează glucoza și dextroza.

Alte teste biochimice:

- testul de reducere a C.T.T. (clorura de trifeniltetrazolium) se face prin cultivarea pe medii conținând 0,5% clorură de trifeniltetrazolium. Examinarea zilnică, timp de 6 zile, permite constatarea unor reacții pozitive (modificarea culorii în roșu) sau negative (mediul rămîne neschimbat);
- testul cu benzidină: tulpinile se însămîntează pe geloză cu ser de cal, la care se adaugă 4% globule roșii de oaie și 0,01% soluție apoasă de benzidină. Reacția pozitivă se traduce prin colorarea în brun-roșcat a coloniilor;
- testul peroxidazei este mai puțin semnificativ.

4 – Examenul capacității hemolitice

Se face prin cultivarea timp de 3 zile la 37°C pe medii cu sînge 5% (agar PPLO). Micoplasmele patogene, mai ales, au capacitatea de a produce hemoliza de tip beta (*M. gallisepticum*, *M. meleagridis*, *M. mycoides*, *M. agalactiae* etc.).

5 – Examine serologice

Vizează pe de o parte depistarea anticorpilor specifici în sîngele animalelor suspecte și pe de alta, identificarea pe baza unor seruri cunoscute, a tulpinilor de micoplasme izolate din infecțiile spontane.

a) Pentru depistarea anticorpilor specifici în sîngele animalelor suspecte se poate folosi reacția de hemoaglutinare.

— Reacția de hemoaglutinare se folosește în lucrările de precizare a infecției cu *M. gallisepticum* la păsările vii. Pentru efectuarea reacției este nevoie în primul rînd de un antigen micoplasmic corespunzător. În acest scop, culturi ale acestui germen pe mediu lichid se supun centrifugării. Sedimentul se spală de 3 ori cu soluție fiziologică după care se suspendă în soluție fiziologică cu adaos 1,5% din citrat de sodiu, 1 picătură de soluție de cristal violet 1% la fiecare 5 ml și mertiolat de sodiu 1/10 000. Volumul de soluție fiziologică, în care se suspendă, trebuie să

fie de 100 de ori mai mic decât al bulionului din care provin micoplasmele. Suspensia obținută în acest fel reprezintă antigenul micoplasmic.

Pentru efectuarea reacției se pune o picătură de sînge obținut prin puncție venoasă sau secționarea crestei, pe o lamă de microscop căreia i se adaugă imediat o picătură de antigen omogenizat în prealabil. Se amestecă prin înclinări repetate ale lamei, eventual se încălzește ușor și după cca 3 minute se citește reacția. În caz pozitiv, se produce aglutinarea corpurilor micoplasmici sub forma de flocoane albe-cenușii.

b) Pentru a identifica tulpinile de micoplasma izolate din infecțiile spontane se pot practica următoarele reacții: reacția de aglutinare a globulelor roșii spălate (hemaglutinare), reacția de inhibare a hemaglutinării.

— **Reacția de hemaglutinare** are la bază proprietatea micoplasmei patogene de a aglutina globulele roșii de pasăre normală. Pentru efectuarea reacției este nevoie de antigen micoplasmic și o suspensie 2% de globule roșii de găină.

Antigenul micoplasmic se obține din culturi în bulion, centrifugate și spălate succesiv, de 3 ori, cu soluție fiziologică tamponată sterilă.

Suspensia de globule roșii se prepară în proporție de 2%. Pentru aceasta sîngele se recoltează pe lichid Alsever, se centrifughează 15 minute la 1500 t/minut, eliminîndu-se supernatantul. Sedimentul eritocitar se spală de 3 ori cu soluție fiziologică, în final realizîndu-se o suspensie de 2%.

Pentru efectuarea reacției se pun în contact diluții crescînde de antigen micoplasmic (începînd cu 1/2) cu cantități constante de suspensie de globule roșii (0,5 ml), în tuburi de reacție și se pun la baie de 37°C, timp de 20 de minute. Dacă suspensia micoplasmică are însușiri hemaglutinante, se va observa apariția fenomenului de aglutinare, de intensități proporționale cu concentrația antigenului micoplasmic.

— **Reacția de inhibare a hemaglutinării** are la bază inhibarea capacității hemaglutinante a suspensiei de micoplasme de către anticorpii specifici conținuți de un ser corespunzător. Pentru efectuarea reacției, antigenul micoplasmic trebuie să aibă un titru aglutinant de cel puțin 1/10 (dacă titrul hemaglutinant este sub 1/10 el trebuie concentrat).

Reacția propriu-zisă constă în punerea în contact a serului specific cu antigenul la 37°C timp de 20 minute (cîte 0,5 ml din ser și antigen, în diluții corespondente). Se adaugă apoi suspensia de eritrocite (0,5 ml) și se pune din nou 20 minute la 37°C.

Reacția pozitivă constă în sedimentarea eritrocitelor, cu un aspect asemănător cu martorul pozitiv (antigen + suspensie eritrocitară) dînd imaginea unei calote compacte de cca 2 mm diametru.

Reacția negativă constă în apariția hemaglutinării, sub forma unui strat subțire, cu marginile franjurate, acoperind aproape tot fundul eprubetei.

Tot o reacție de tipizare serologică este și *inhibarea dezvoltării micoplasmei pe medii de cultură*, prin folosirea de antiseruri specifice. După o tehnică simplă, se însămîntează din culturi în bulion, plăci cu medii nutritive solide, după care se zvîntă 20—30 minute la termostat și se aplică discuri îmbibate cu antiseruri cunoscute. Interpretarea constă în observarea existenței în jurul discurilor a zonelor de inhibiție a dezvoltării micoplasmei.

Se pare că inhibarea creșterii prin anticorpi specifici este cea mai sensibilă metodă de identificare. Ea se poate folosi nu numai în identificarea tulpinilor de micoplasme izolate ci și în determinarea anticorpilor din serul animalelor din focare de boală (în acest caz se lucrează cu antigene micoplasmice cunoscute).

Se mai pot folosi și reacțiile de hemadsorbție și inhibare a hemadsorbției. Se știe că globulele roșii ale diverselor specii pot fi adsorbite pe suprafața coloniilor de micoplasme. Dacă coloniile sînt tratate în prealabil cu seruri specifice corespunzătoare fenomenul de adsorbție nu mai are loc. Reacțiile se execută în godeurile unor plăci de material plastic. Pe fundul godeurilor, se repartizează o cantitate de 0,1 ml geloză PPLO. Mediul se însămînțează, astfel ca după incubare să rezulte 5—20 colonii.

În cazul reacției de hemadsorbție, se adaugă peste colonii, 0,025 ml suspensie de globule roșii 0,5% și se incubează timp de 30 de minute la 37°C. Apoi placa se spală cu soluție fiziologică tamponată și se examinează la microscop. Coloniile vor apărea, în caz pozitiv, tapisate cu globule roșii.

În cazul inhibării hemadsorbției, peste colonii, se pun întii 0,025 ml ser specific (eventual în diferite diluții). După 30 de minute de contact, la temperatura camerei, se adaugă cîte 0,025 ml suspensie de globule roșii 0,5%. Se incubează 30 de minute la 37°C, după care placa se spală cu soluție fiziologică. În cazul reacției pozitive (inhibarea hemadsorbției) coloniile nu trebuie să fie acoperite cu hematii.

6 – Inoculări experimentale

În acest scop se folosesc în special ouăle embrionate. Inocularea pe cale intravitelină sau în camera alantoidiană produce moartea embrionilor după 4—6 zile, cu fenomene hiperemice cutanate și viscerale. La unii din ei și mai ales la cei care mor după 6—7 zile de la infecție, se constată aproape constant pericardită.

7 – Izolarea și cultivarea micoplasmelor pe culturi celulare

Se folosesc culturi omoloage speciei animale de la care se izolează tulpina. Prin multiplicare, unele tulpini produc efect citopatic, în timp ce altele nu determină modificări celulare evidente. Controlul prezenței micoplasmelor în aceste culturi celulare se face prin reînsămînțări pe agar PPLO.

8 – Examenul histopatologic

Servește pentru diagnosticul infecțiilor micoplasmice la păsări, în care se produc o serie de modificări tisulare cu o importantă valoare diagnostică.

Drept materiale patologice se folosesc porțiuni de mucoasă, recoltate de la nivelul căilor respiratorii (sinusuri, mucoasă nazală, traheală) sau, mai puțin indicat, țesut pulmonar. Prelucrarea acestora, după tehnicile obișnuite (în stare proaspătă, prin secționare la gheață sau în stare fixată, prin incluzie în parafină) permite obținerea de secțiuni în care se pot identifica, la examenul microscopic, modificări cu o semnificație diagnostică importantă: hiperplazia mucoasei, cu pierderea cililor vibrațili ai epiteliului de acoperire, infiltrație monocitară difuză sau în focare și hiperplazia glandelor epiteliale sub formă de amforă. În pulmon și sacii aerieni, se găsesc focare de infiltrație limfocitară, granuloame cu celule gigante.



Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micozelor

Micozele sînt boli produse prin localizarea și multiplicarea la nivelul țesuturilor a unor specii de ciuperci patogene sau condiționat patogene, ele putînd fi întîlnite atît la animale cît și la om.

În funcție de localizarea micetilor, se deosebesc două categorii de micoze: superficiale sau cutanate (dermatomicoze) și profunde, respectiv micozele viscerale.

Precizarea naturii micotice a unei boli și mai ales identificarea speciei care a produs-o se pot face numai cu ajutorul unor metode de laborator, dintre care o importanță majoră prezintă:

— examenul macroscopic, examenul microscopic, examenul cultural, testele biochimice, examenul histopatologic, testarea patogenității prin inoculări experimentale.

Recoltarea, ambalarea, conservarea și transportul materialului patologic în vederea examenului micologic de laborator

Data fiind transmisibilitatea bolilor micotice, manevrarea produselor patologice, începînd cu recoltarea și continuînd cu ambalarea, transportul și prelucrarea lor, se va face în condiții de sterilitate perfectă și cu multă atenție.

Pe de altă parte, este important să se lucreze steril (condiție ce se referă inclusiv la instrumentarul și ustensilele de laborator folosite) și cu scopul de a se preveni contaminarea cu alți germeni a materialului patologic și a mediilor de cultură.

Legat de aceste aspecte, trebuie menționat faptul că folosirea antisepticelor antibacteriene este inefficientă în cazul de față, datorită rezistenței mari pe care fungii o manifestă față de acestea. Ca urmare, sterilizarea se va face prin mijloace termice (flambare, autoclavare etc.).

Ca materiale patologice pentru diagnosticul de laborator al micozelor, se pot folosi: cruste, scvame, fire de păr, pene, exsudate, membrane, secreții fluide și semifluide, noduli, urină, lapte, sînge, fragmente de țesuturi și organe etc. recoltate, după caz, de la animale bolnave sau cadavre. Alegerea unora sau altora din aceste materiale se face în funcție de datele anamnetice, clinice, anatomopatologice.

În funcție de natura materialului patologic, se recomandă ca recoltarea să se facă astfel:

- firele de păr se recoltează prin smulgere cu pensa din zona marginală a leziunii (firele lipsite de luciu, decolorate, casante); ele se transportă în eprubete sau plăci Petri sterile, eventual între două lame;

- scvamele se recoltează cu o pensă sterilă, prin raclare cu un bisturiu steril sau cu ajutorul unor tampoane sterile îmbibate în prealabil în ser fiziologic steril. Ambalarea în vederea transportării lor la laborator se face în același mod ca și pentru firele de păr;

- exsudatele, secrețiile fluide și semifluide se recoltează cu pipete Pasteur sau cu ajutorul unor tampoane sterile și se introduc în eprubete sterile;

- secrețiile consistente (noduli sau grunji) se recoltează cu pense sterile, evitându-se strivirea lor; se transportă în eprubete sterile;

- lichidele de puncție se recoltează cu pipeta Pasteur sau seringi sterile;

- urina de la animale bolnave se recoltează cu un cateter în eprubete sterile, iar de la cadavre cu seringi sterile;

- secrețiile nazale, bucale, vaginale, de la animalele vii se recoltează cu tampoane sterile care se introduc apoi în eprubete cu ser fiziologic steril;

- materiile fecale se recoltează cu tampoane care se introduc în eprubete ce conțin soluție fiziologică cu adaos de antibiotice (500—5000 U.I. penicilină/ml);

- laptele se recoltează în eprubete sterile, din fiecare sfert, după ce în prealabil s-au făcut spălarea și dezinfectarea mameloanelor;

- fragmentele de țesuturi sau organe cu leziuni se recoltează cu ajutorul unor foarfeci sau bisturie sterile.

În ceea ce privește conservarea și transportul probelor la laborator este recomandabil ca acestea să se facă în condiții de umiditate și temperatură scăzută și într-un timp cât mai scurt posibil (probele de lapte trebuie să ajungă la laborator în maximum 5 ore de la recoltare).

1 – Examenul macroscopic

Examenul macroscopic al leziunilor oferă date pur orientative pentru diagnosticul micozelor cutanate și viscerale.

În cazul dermatomicozelor, se iau în considerare: localizarea, forma și dimensiunile placardelor, caracterul lor circumscris sau confluent, prezența și aspectul crustelor, aspectul firelor de păr (fără luciu, decolorate, casante, pseudotunderea).

În cazul micozelor viscerale, leziunile sînt foarte variate (ulcerații, microabcese, formațiuni necrotice nodulare, pseudomembrane etc.), nespecifice și cu multiple localizări.

Ca urmare, acest prim examen trebuie însoțit în mod obligatoriu, în ambele cazuri, de celelalte mijloace de investigație de laborator (examenul microscopic, cultural, histopatologic, biochimic), care dau posibilitatea precizării etiologiei bolii în cauză.

2 – Examenul microscopic direct

Examenul microscopic direct oferă date cu privire la prezența sau absența micetelor în materialul patologic, fiind ușor și rapid de executat. Are însă o valoare limitată în ceea ce privește identificarea ca gen sau specie a fungilor.

Pentru a asigura o bună evidențiere a elementelor fungice în preparatele microscopice native, materialul patologic se va trata în prealabil cu o soluție disociantă (clarificantă) care are totodată și rol de protecție a examinătorului, prin acțiunea fungicidă (fixatoare) de care dispune. Se pot folosi în acest scop:

- hidratul de sodiu sau de potasiu în concentrație de 10–30%
- cloral-lactofenolul care se prepară din:
 - cloral hidrat cristalin 20,0 g
 - fenol cristalin 10,0 g
 - acid lactic 10,0 g
- lactofenolul Amann, compus din:
 - fenol cristalin 10,0 g
 - acid lactic 10,0 g
 - glicerină 20,0 g
 - apă distilată 10,0 ml

La acest amestec se poate adăuga un colorant specific pentru fungi blaucotton (în proporție de 0,5%).

- sulfura de sodiu în soluție hidroalcoolică 10%, compusă din:
 - sulfură de sodiu 1,0 g
 - alcool pur 2,5 ml
 - apă distilată 7,5 ml

Se păstrează în sticle de culoare închisă, la adăpost de lumină, timp de cca 3–4 săptămâni.

Tehnica de lucru. În cazul materialelor patologice fluide și semi-fluide, se etalează pe o lamă curată o picătură de clarificant (lactofenol, KOH, NaOH), peste care se pune o cantitate foarte mică din materialul de examinat. Se acoperă cu o lamelă fină, avînd grijă să nu se formeze bule de aer și se examinează la microscop cu obiectivul 20 × sau 40 × și ocular 10.

În cazul materialelor patologice cu o consistență mai mare (cruste, fire de păr, scvame etc.) este necesar să se folosească pentru clarificare, o soluție disociantă mai puternică cum este sulfura de sodiu 10%, KOH sau NaOH în concentrație de 10–30%, din care se etalează cîteva picături pe lamă; se pun apoi cîteva fragmente din materialul de examinat, se aplică lamela și se examinează imediat, în cazul în care s-a folosit sulfura de sodiu, sau după 20–30 minute dacă s-a folosit KOH sau NaOH. Timpul de disociere poate fi redus în cazul ultimelor soluții prin încălzirea ușoară a lamelor la flacără (fără să fiarbă).

Dacă totuși rezultatul nu este satisfăcător, se poate recurge la un alt procedeu și anume: într-o eprubetă în care s-a pus materialul de examinat se adaugă hidrat de potasiu 30%, se amestecă bine pentru a activa disocierea, după care se diluează cu apă distilată și se centrifughează. Din sedimentul ce se obține, se fac preparate microscopice, folosind lamele fine care să permită examinarea cu un obiectiv mare.

Metode de colorare a micetilor în frotiuri. Vizualizarea elementelor fungice în preparatele microscopice efectuate direct din materialul patologic poate fi facilitată și prin folosirea unor metode de colorare, care oferă în același timp și avantajul obținerii unor preparate imperisabile, cu o durată mare de conservabilitate.

Metoda Hotchkiss—McManus. *Tehnica de lucru.* Se disociază materialul patologic (în special produsele cornoase: peri, scvame, cruste) cu potasă caustică, se fragmentează în porțiuni mici și se depune pe lame bine degresate și unse cu gelatină sau albumină Mayer. Preparatele astfel obținute se usucă la etuvă la 55°C timp de 2 minute, după care:

- se fixează în alcool 70° timp de 2 minute
- se spală cu apă distilată
- se introduce într-o baie conținând soluție apoasă 1% de acid periodic, unde se ține 5 minute
- spălare cu apă de robinet timp de 2 minute
- tratare cu reactiv Schiff timp de 10 minute
- se trec apoi preparatele succesiv prin 3 băi cu apă sulfuroasă, câte 5 minute în fiecare baie
- spălare cu apă distilată și alcool 95°, timp de 2 minute
- deshidratare în alcool absolut, timp de 2 minute
- clarificare în xilol — 2 minute
- montarea în balsam de Canada.

În urma acestei colorări, formațiunile micotice apar de culoare vișinie-intensă, putându-se observa foarte bine filamentele miceliene, artrosporii, organele de fructificare, celulele levurice.

Această metodă se pretează foarte bine și pentru colorarea micetilor în fragmente de țesuturi obținute prin biopsie. În acest caz, țesutul parazitat prezintă o culoare liliachie, pe fondul căreia se observă formațiunile micotice colorate în vișiniu-intens.

Colorarea rapidă pentru dermatofiți (după Schwartz și Lamkins) folosește un amestec format din o parte soluție KOH 10% + o parte soluție umectantă (obținută prin dizolvarea în 100 ml apă distilată a 0,15 g benzoat de sodiu și 0,85 g dioctyl sodium sulfocinat) + 2 părți cerneală persistentă albastră-neagră. Acest colorant se poate păstra în condiții bune timp de 2 luni.

Tehnica de lucru este extrem de simplă. Pe o lamă curată se așază câteva fragmente de fire de păr sau scvame împreună cu o picătură din colorantul menționat; se acoperă cu o lamelă fină și se încălzește ușor la flacără. Se presează apoi lamela cu multă grijă pentru eliminarea excesului de colorant și se examinează la microscop. Elementele fungice apar colorate în albastru.

Identificarea fungilor în preparatele microscopice efectuate direct din materialul patologic se face pe baza următoarelor criterii morfologice:

- genul *Trichophyton*, tipul microid, este caracterizat prin spori de dimensiuni mici (2—3 microni diametru), dispuși uneori în lanțuri ce formează manșoane în jurul firelor de păr; filamentele miceliene se dezvoltă în interiorul firului de păr (tip de parazitare mixtă ecto-endo-trix); tipul megaspor prezintă spori de dimensiuni mai mari (4—6 microni), având același mod de parazitare ecto-endotrix;
- genul *Microsporum* prezintă spori de dimensiuni mici (2 microni

diametru), sferici, formînd un manşon în jurul firelor de păr, filamentele miceliene se dezvoltă în interiorul firelor de păr;

— genul *Aspergillus* are miceliul format din hife septate, ramificate, conidioforii pornind dintr-o celulă bazală; distal, prezintă o columelă de pe suprafaţa căreia pornesc lanţuri de conidii prinse prin sterigme; conidiile au 2—3 microni diametru şi pot fi de culoare brună, verde sau neagră;

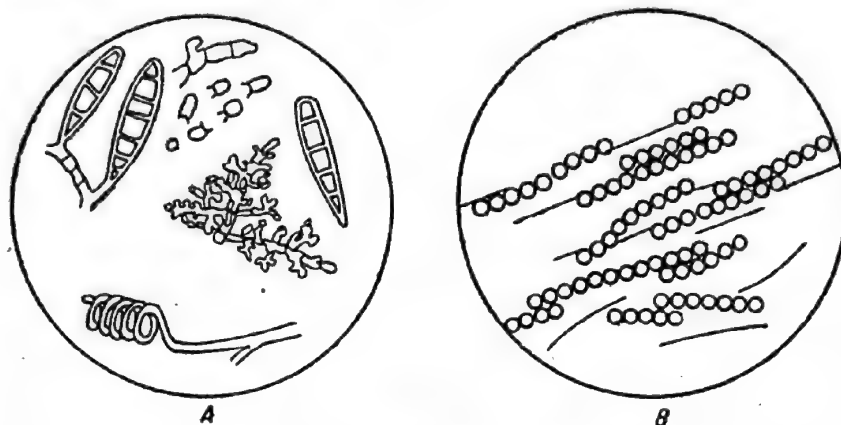


Fig. 147 — *Trichophyton mentagrophytes*
A — in vitro; B — in vivo

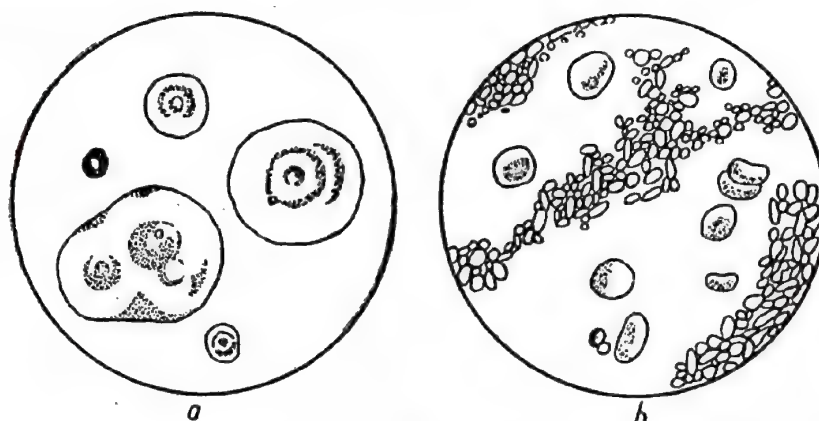


Fig. 148 — *Cryptococcus neoformans*
a — in vitro; b — in vivo

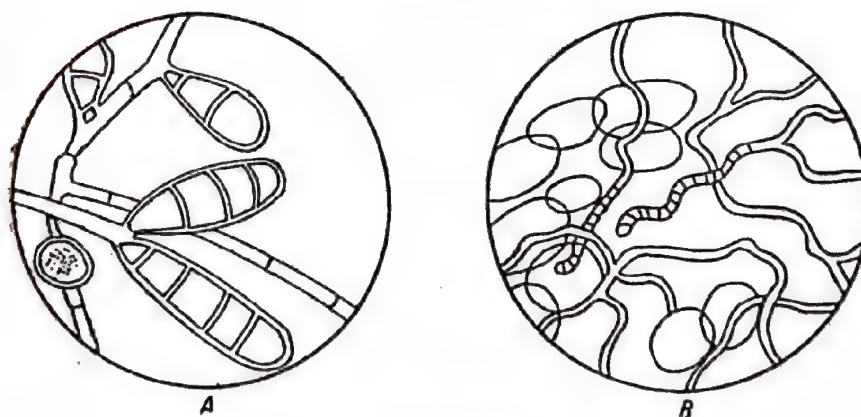


Fig. 149 — *Epidermophyton floccosum*
A — in vitro; B — in vivo

— genul *Candida* este caracterizat prin celule sferice, ovoide uneori pseudomicelii formate din celule alungite, unite cap la cap, avind diametrul de 2—5 microni;

— genul *Geotrichum* prezintă celule cilindrice, ovoide, cu lungimea de 6—10 microni;

— genul *Torulopsis* prezintă celule sferice sau ovale, cu muguri numeroși, cu diametrul de 2—5 microni;

— genul *Cryptococcus* prezintă celule ovale, sferice, cu dimensiuni de 5—20 microni, cu capsulă gelatinoasă; pot exista și celule înmugurite, fără capsulă;

— genul *Nocardia* prezintă forme bacilare fine și filamente fine, ramificate neregulat;

— genul *Actinomyces* prezintă filamente ramificate, fine, în rozetă, cu diametrul de 1 micron;

— genul *Hystoplasma* este caracterizat prin filamente subțiri, cu diametrul de 2,5 microni, chlamidospori prinși cu un pedicul, cu blastospori unipolari, sferici, avind 2—4 microni diametru;

— genul *Coccidioides* este caracterizat prin miceliu septat, ramificat, dilatat din loc în loc sub formă de rachetă;

— genul *Penicillium* prezintă un miceliu septat, incolor, din care pleacă conidioforul, despărțit de miceliu printr-un sept distal; conidioforii sînt ramificați, conidiile sînt dispuse în lanț prinse de sterigme; spori mici, sferici, verzui;

— genul *Mucor* este caracterizat prin hife neseptate, sporangiofori simpli sau ramificați, terminați cu o veziculă (columela) sferică, piriformă sau cilindrică, plină cu spori sferici, muriformi și netezi; nu prezintă rhizoizi;

— genul *Absidia* — sporangioforii pornesc din porțiunile internodale, columela veziculară este plină cu spori incolori;

— genul *Rhizopus* — sporangioforii pornesc din același loc cu rhizozii, formînd noduri; columela emisferică este așezată pe o apofiză; sporangii sînt de culoare neagră;

— genul *Sporotrichum* prezintă un miceliu subțire, ramificat, conidioforii sînt scurți, cu conidii piriforme izolate sau în mănunchi, ovale, rotunde, cilindrice, situate în vîrf sau lateral;

— genul *Scopulariopsis* prezintă hife, conidiofori ramificați, neregulați, cu conidii dispuse în lanț, legate prin sterigme; conidiile pot fi brune, galbene, echinulate;

— genul *Alternaria* prezintă micelii scurte, septate, conidiofori simpli sau ramificați, groși, de culoare neagră, cu conidii alungite, dispuse în lanț, negre; conidiile prezintă septuri transversale și longitudinale cu aspect de mură;

— genul *Trichothecium* are hife septate, conidiofori simpli, conidiile eliptice, incolore, sub formă de sferule dispuse în mănunchi;

— genul *Chladosporium* este caracterizat prin hife brune, septate, conidioforii poartă conidii așezate în formă de coroană de copac; conidiile pot fi uni- și bicelulare, cilindrice, cu capetele rotunjite;

— genul *Helmintosporium* are hife septate, brune, conidiofori scurți, conidii pluricelulare, septate transversal, dispuse grupat sau solitar, de culoare neagră.

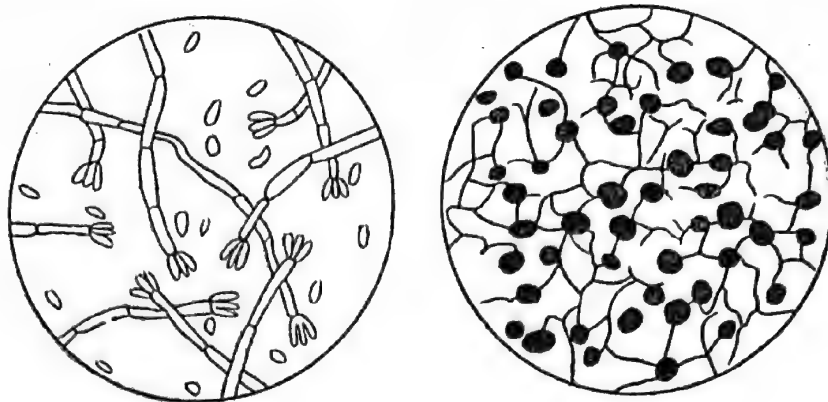


Fig. 150 — *Stahybotrys alternans*

Trebuie menționat faptul că ciupercile din genurile *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Scopulariopsis*, *Chladosporium*, *Helmintosporium*, nu sînt citate ca agenți patogeni ai micozelor viscerale, ci ca fungi contaminanți ce apar foarte frecvent în laboratoare. Cunoașterea lor însă este foarte importantă pentru stabilirea corectă a unui diagnostic micologic.

Tot în scopul evitării eventualelor erori de diagnostic, examinatorul trebuie să aibă în vedere prezența în preparatele microscopice a unor artefacte cum sînt:

— „mozaicul fungic” sau fungii falși — (se deosebesc de miceliile adevărate prin faptul că au diametrul neuniform, sînt dispuse în mod ne-

	<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>
Examen direct	<p>Levuri burjeonante rotunde 2-4 μ ovalare</p> <p>Filamente miceliene</p>	<p>Artrospori rectangulari</p> <p>Artrospori ovalari</p>	<p>Levuri \pm capsulate 5-20 μ</p>	<p>Levuri</p>
	<p>Levuri</p> <p>Chlamydospori de <i>C. albicans</i></p> <p>Filamente pe medii de cultură</p>	<p>Filamente fragmentate</p>		<p>Levuri ascosporulate</p> <p>Asce</p> <p>Medii speciale</p>

Fig. 151 — *Candida*, *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* (examen direct și culturi)

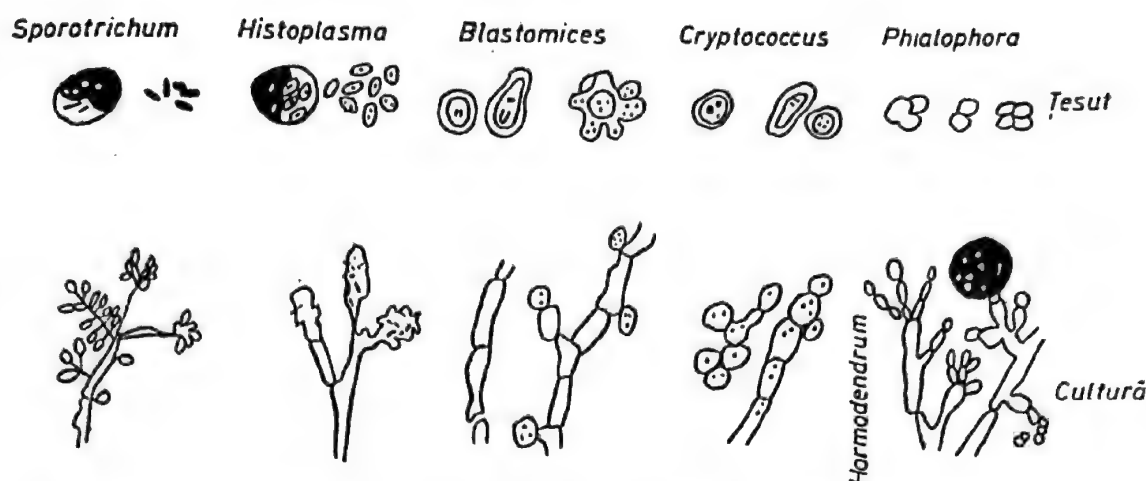


Fig. 152 — Diferențierea citorva specii de ciuperci patogene (după Hallmann)

regulat și au marginile zimțate; apar mai frecvent în preparatele native efectuate din cruste trichofitice);

— granulele de cheratină, fibrele elastice, vacuolele de aer, cristalele de substanțe alcaline rezultate în urma supraîncălzirii lamelor (aceste cristale au margini poliedrice, sînt dispuse neregulat și sînt foarte transparente);

— picături de grăsimi ce se pot confunda cu celulele levurice și conidiile; se deosebesc de acestea prin faptul că au o membrană dublă, sînt refringente și dispuse în mod neuniform.

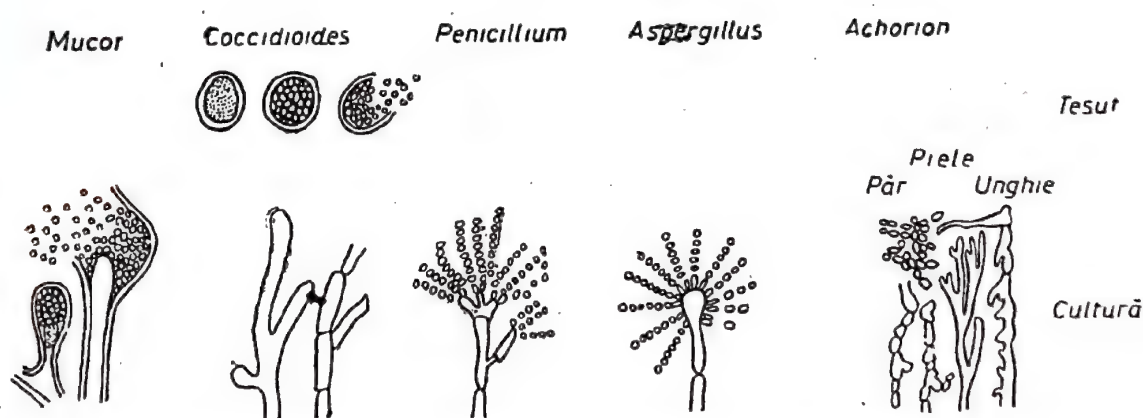


Fig. 153 — Diferențierea unor ciuperci prin aparatul de fructificare (după Hallmann)

3 — Examenul cultural

Constituie alături de examenul microscopic direct, o probă obligatorie de diagnostic, fiind de un real ajutor în încadrarea în familie, gen și chiar specie a ciupercii examinate. El constă în însămînțarea materialului patologic pe medii de cultură special destinate acestui scop.

Mediul Sabouraud solid este un mediu de bază utilizat pentru cultivarea fungilor filamentoși, a fungilor levuriformi și a dermatofiților. Se compune din:

- agar 20,0 g
- peptonă 10,0 g
- glucoză sau maltoză 40,0 g
- apă distilată 1 000,0 ml

Se dizolvă peptona și glucoza (sau maltoza) într-un balon cu fund plat, după care se adaugă agarul și se încălzește încet la autoclav până la 115—120°C; se lasă apoi să coboare temperatura la cca 100°C și se filtrează repede la cald, prin vată hidrofiliă. Se repartizează în recipiente, după necesități, și se sterilizează prin autoclavare. În momentul folosirii, se toarnă în plăci Petri sau în eprubete, în poziție înclinată.

Prin scăderea procentului de glucoză sau maltoză la 2%, acest mediu poate servi foarte bine pentru cultivarea micetelor levuriforme.

Pentru inhibarea dezvoltării unor bacterii, se poate adăuga mediului de cultură topit și răcit la 50°C, înainte de a fi turnat în plăci, unul din următoarele antibiotice:

- cicloheximidă (actidionă) în proporție de 0,5%
- penicilină G 500 U.I./ml mediu
- streptomicină 100 gamma/ml mediu
- aureociclină 50—100 gamma/ml mediu
- cloromicetina 0,01 g/30 ml mediu
- penicilină 20 U.I./ml + streptomicină 40 gamma/ml

— *Mediul Sabouraud lichid* se prepară din aceleași ingrediente ca și mediul Sabouraud solid, fără a se adăuga agar.

— *Mediul Czapeck* se compune din:

- NaNO₃ 2,0 g
- KH₂PO₄ 1,0 g
- MgSO₄ 0,5 g
- KCl 0,5 g
- FeSO₄ 0,01 g
- zaharoză 30,0 g

În loc de zaharoză, pentru izolarea unor ciuperci, se poate folosi glucoza. După preparare, se poate utiliza ca atare, cu 2% agar sau cu 10% gelatină.

— *Mediul cu extract de drojdie de bere* se folosește pentru cultivarea fungilor levuriformi și a dermatofitelor. Se obține din:

- extract de drojdie de bere 1 000,0 ml
- glucoză sau maltoză 35,0 g
- geloză 20,0 g

Se ajustează pH-ul la 5,6 și se sterilizează la 121°C timp de 10 minute.

Extractul de drojdie de bere se prepară astfel: se dizolvă 100,0 g drojdie de bere în 1000 ml apă distilată și se fierbe timp de 5 minute. Se filtrează și se răcește, după care se adaugă restul ingredientelor.

— *Mediul cu extract de malt* are aceeași utilizare ca și precedentul. Se compune din:

- extract de malt 1 000,0 ml
- dextroză 20,0 g
- peptonă 1,0 g
- geloză 20,0 g

Pentru obținerea extractului de malț se usucă orz incolțit în etuvă la 30—35°C după care se mojarază. Se amestecă 250 g din mojaratul obținut cu 1000 ml apă distilată, se încălzește timp de 1 oră la 60°C, amestecându-se continuu. Se filtrează, se răcește și se adaugă restul ingredientelor, după care se ajustează pH-ul la 5,6. Se sterilizează timp de 10 minute la 121°C.

— *Mediul cu extract de orez* este indicat pentru cultivarea fungilor aflatoxigeni din genul *Aspergillus* și *Penicillium*. Se compune din:

- extract de orez 1 000,0 ml
- geloză 20,0 g

Extractul de orez se prepară astfel: se amestecă 500 g orez decorticat cu 1000 ml apă distilată, se fierbe amestecul timp de 30 minute, după care se filtrează și se lasă să se răcească pînă a doua zi cînd se adaugă geloză. Se sterilizează la 120°C timp de 20 minute.

— *Mediul cu extract de cartofi*. Acest mediu favorizează sporularea și conservarea ciupercilor, fiind preparat din:

- extract de cartofi 1 000,0 ml
- agar 20,0 ml

Pentru prepararea extractului, se curăță și se spală cartofii, după care se dau pe o răzătoare fină. Se amestecă apoi 20 g din cartofii răzuiți cu 1000 ml apă distilată, se lasă la temperatura camerei timp de 1 oră pentru macerare, apoi se fierbe timp de 5 minute. Se filtrează prin vată, se adaugă agarul și se ajustează pH-ul la 5,6. Se sterilizează la 110°C timp de 20 minute.

— *Mediul cu extract de morcovi* se obține în același mod, utilizînd în loc de cartofi, o cantitate egală de morcovi.

— *Mediul Raulin* este indicat pentru cultivarea speciilor pigmentogene din genurile *Aspergillus* și *Penicillium*. Se compune din:

- acid tartric 4,0 g
- carbonat de potasiu 0,6 g
- carbonat de magneziu 0,4 g
- nitrat de amoniu 4,0 g
- fosfat de amoniu 0,6 g
- sulfat de amoniu 0,25 g
- sulfat de fier 0,07 g
- sulfat de zinc 0,07 g
- silicat de potasiu 0,07 g
- zaharoză 70,0 g
- agar 30,0 g
- apă distilată 1500,0 ml

Se dizolvă ingredientele cu excepția zaharozei în 1000 ml apă distilată (zaharoza se dizolvă separat în 500 ml apă distilată). Se sterilizează separat cele două soluții timp de 20 minute la 110°C și se amestecă doar în momentul folosirii. În final pH-ul mediului trebuie să fie de 2,9.

— *Mediul pentru evidențierea pigmentului la ciupercile din genul Trichophyton*

- agar 15,0 g
- mălai 40,0 g
- apă 1 000,0 ml

Se fierbe mălaiul în cca 300—500 ml apă timp de 1 oră, se filtrează și se adaugă filtratul în agarul introdus în apă. Se completează cu apă până la 1000 ml, se autoclavează 20 minute la 120°C.

— *Mediul agar-miere pentru cultivarea ciupercilor din genul Microsporum*

— miere	60,0 g
— peptonă	10,0 g
— agar	20,0 g
— extract de drojdie (bacto)	5,0 g
— apă	1 000,0 ml

— *Mediul orez-bilă pentru chlamidospori*

— orez	20,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml
— geloză	20,0 g
— bilă proaspătă	20%

Se fierbe orezul cu 300 ml apă timp de 45 minute, se filtrează prin tifon, se adaugă geloză și se completează cu restul de apă distilată (sterilizarea la 115°C timp de 15 minute), după care se adaugă bila.

— *Mediul Nikerson-Mankowski*

— fosfat monopotasic	1,0 g
— sulfat de amoniu	1,0 g
— biotină	5,0 g
— albastru de tripan	0,10 g
— agar	15,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă toate substanțele, se autoclavează, se adaugă 20,0 g glicogen sau amidon purificat și sterilizat prin tindalizare.

Chlamidosporii fixează electiv albastru de tripan.

— *Agar selectiv DTM Taplin pentru dermatofiți* se folosește pentru izolarea și diferențierea rapidă a dermatofiților din materiale mai mult sau mai puțin contaminate cu bacterii sau alți fungi.

În afară de gentamicină, clortetraciclină și cycloheximidă care inhibă dezvoltarea ciupercilor saprofite, mediul conține și fenol roșu ca indicator pentru fermentarea glucozei, cunoscând că cele mai multe ciuperci saprofite scindează glucoza cu acidifierea mediului. Prin contrast dermatofiții (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) prin dezaminarea peptidelor determină o alcalinizare a mediului care este slab acid. Prin aceasta se pot diferenția dermatofiții de alți germeni în procent de 97%.

Compoziția mediului :

— peptonă de făină de soia	10,0 g
— D(+) glucoză	10,0 g
— roșu fenol	0,2 g
— cycloheximidă	0,5 g
— gentamicină sulfat	0,1 g
— clortetraciclină	0,1 g
— agar-agar	17,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml
pH-ul final = 5,5	

Dezvoltarea dermatofitelor pe acest mediu determină virarea culorii acestuia spre roșu după 72 de ore de incubare, coloniile având culoarea albă.

În vederea însămînțării, perii, scvamele și crustele depuse pe o lamă sterilă, se fragmentează în porțiuni cât mai mici cu ajutorul unor instrumente sterile (bisturiu, lamă de ras etc.). Cu vârful unei anse bacteriologice flambat și răcit într-un vas cu apă distilată sterilă, se ridică particule din materialul astfel pregătit și se depun pe suprafața mediului de cultură, în diferite puncte.

Produsele semifluide sau lichide se pot însămînța fie cu ajutorul unui tampon de vată steril, de tipul celui folosit pentru recoltarea exsudatelor faringiene, fie cu ansa de însămînțare sau cu pipeta Pasteur.

Materiile fecale se lasă mai întâi la macerat timp de 24 ore în soluție de ser fiziologic cu adaos de antibiotice și după aceea se însămînțează pe mediul de cultură.

Operațiunile trebuie executate la flacără și cât mai rapid pentru a evita contaminările cu germeni din exterior.

Din fiecare probă se însămînțează cel puțin 2 tuburi (preferabil mai multe). O serie de tuburi se lasă la temperatura de 20—24°C iar alta se pune la termostat la 37°C.

După însămînțare, culturile se vor examina zilnic, notîndu-se de fiecare dată aspectul macroscopic (suprafață, relief, culoare, prezența pigmentării, consistența, durata dezvoltării, care poate varia de la cîteva zile la 2—3 săptămîni). Aceste date se completează cu examenul microscopic periodic al fragmentelor de colonii. În acest scop, se recoltează din puncte diferite de pe suprafața și din profunzimea coloniilor, mici porțiuni, cu vârful unei anse de însămînțare sau cu vârful unui ac de disociere, în prealabil flambate, care se vor depune pe lame degresate, împreună cu cîteva picături de soluție clarificatoare. Se poate recurge și la metode de colorare a preparatelor microscopice efectuate din culturi, în scopul unei mai bune vizualizări a elementelor morfologice.

Metode de colorare a preparatelor microscopice efectuate din culturi. În vederea colorării, se suspensionează un mic fragment recoltat dintr-o colonie, într-o picătură de apă distilată sterilă, depusă pe o lamă degresată. Suspensia etalată pe lamă se usucă la temperatura camerei și se fixează după anumite procedee în funcție de metoda de colorare care urmează să se aplice.

Colorarea cu albastru de metilen (pentru fungi levuriformi). Se folosește o soluție apoasă de 1% de albastru de metilen cu care se acoperă froțiul, lăsîndu-se în contact 2 minute. Se spală apoi cu apă, se usucă și se examinează.

Colorarea cu bleu cotton-acetic. Preparatul uscat se fixează prin evaporare cu alcool 95°, se imersează apoi într-o soluție de bleu cotton-acid acetic timp de 1 minut, se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează.

Soluția de bleu cotton-acid acetic se obține din 0,5 g bleu cotton + 100 ml soluție 30% de acid acetic.

Metoda Burri. Se omogenizează pe o lamă degresată 1 picătură de apă distilată cu 1 picătură de tuș de China.

Se suspensionează în acest amestec o cantitate de material recoltat cu ansa dintr-o cultură pe mediu solid.

Se usucă și se examinează.

Colorația biacidă Mann. Se fixează frotiul la cald, se răcește și se colorează timp de 1 minut cu un amestec colorant obținut din:

- soluția apoasă 1% eozină 45,0 ml
- soluție apoasă 1% albastru de metilen sau bleu cotton 35,0 ml
- apă distilată 100,0 ml
- Spălare cu apă de robinet
- Colorare cu soluție alcoolică (70°) de oranj G — 1 minut
- Spălare cu apă
- Uscare
- Clarificare cu toluen și examinare.

Metoda Mann modificată (pentru blastospori și artrospori). Se efectuează suspensia fungică pe o lamă degresată

- Uscare la 37°C
- Fixare prin evaporare cu alcool 95°
- Colorare prin metoda biacidă Mann

Metoda Kufferath modificată de Langeron și Guerro. Uscare și fixare prin căldură (pe o platină șofantă)

- Colorare cu fucsină Ziehl
- Spălare cu apă
- Decolorare timp de câteva secunde cu alcool clorhidric 1% apoi cu alcool lactic 2%

- Spălare cu apă de robinet
- Colorare cu albastru de Nil 1% — 30 secunde
- Spălare cu apă distilată
- Peste frotiul încă umed se aplică o picătură de tuș de China diluat, care se etalează în strat subțire pe toată lama
- Uscare și examinare

Ascosporii se colorează în roșu iar ascele și blastosporii în albastru-verde pe un fond întunecat.

Colorația Rackette (pentru ascospori). Fixarea frotiului

- Colorare la cald cu o soluție apoasă saturată de verde de malahit, timp de 5 minute
- Spălare temeinică cu apă de robinet
- Colorare cu soluție apoasă 0,25% de safranină
- Spălare, uscare, examinare

Metoda Gray (pentru chlamidospori). Se întrebuintează două soluții:

- Soluția A:
 - verde de malahit 0,5 g
 - fucsină bazică 0,05 g
 - apă distilată 100,0 ml

- Soluția B:
 - soluție 8% NaCl

Tehnica de lucru:

- Fixarea frotiului
- Colorare cu un amestec format din 2 părți soluție A + 8 părți soluție B, timp de 10 minute
- Spălare cu apă

- Colorare cu soluție 5% nigrosin — 2 minute
- Spălare, uscare, examinare
- Colorația Müller (pentru spori). Fixare**
- Colorare cu soluție 5% de acid cronic — 5 minute
- Spălare cu apă
- Colorare la cald cu fucsină Ziehl
- Se răcește frotiul și se decolorează cu soluție 5% de acid sulfuric
- Spălare cu apă
- Recolorare cu albastru de metilen Löffler
- Spălare, uscare, examinare.
- Colorația Gram (vezi examenul microscopic al bacteriilor)**

Tabelul 9

Caracterele morfo-culturale ale principalelor tipuri de fungi

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
<i>Trichophyton</i>	Colonii mici, de cca 1 cm diametru, reliefate, suprafața glabră, ceroasă sau pufoasă, de culoare albă sau albă-gălbuie; centrul coloniei cu aspect crateriform, înconjurat de zone concentrice ale coloniei, aderente la mediu	Miceliu abundent; chlamidospori dispuși în lanțuri; lipsesc artrosporiile și aleuriile
<i>Trichophyton</i> tip favic	Colonii aplatizate, cu suprafața prăfoasă, de nuanță roz-pal	Hife septate, aleurii dispuse în akladium
<i>Microsporum</i>	Colonii de culoare albă care devin cu timpul gălbui-verzui, aspect pufoș, centrul consistent, reliefat; au caracter invadant cu aspect linos	Miceliu ramificat, segmentat, cu extremitățile în formă de rachetă; formațiuni fusiforme, lungi de 80 microni, late de 20 microni, îngroșate la mijloc și subțiri la capete, pluriseptate, libere sau prinse de filamente
<i>Aspergillus</i>	Colonii invadante, cu suprafața rugoasă, albe-verzui, conidiofori aeriени cu conidiospori caracteristici; culoarea diferă după specie	Miceliu abundent, cu hife septate, incolore, ramificate; conidioforii pornesc dintr-o celulă bazală ne-septată, care la partea distală prezintă columela de care sînt fixate sterigmele și în continuare lanțurile de conidii sferice diferit colorate în funcție de specie; ascosporii sînt sferici, bruni
<i>Candida</i>	Colonii rotunde, albe, netede, lucioase, opace, margini regulate, nu pigmentează mediul	Lanțuri de pseudomicelii cu celule ovoide la nivelul strangulațiilor pseudomiceliene și celule rotunde, ovoide, libere, unele înmugurite
<i>Geotrichum</i>	Colonii mici, cremoase, albe sau gălbui, aderente la mediu, ușor ondulate, uneori cu pseudomicelii rareori ramificate	Artrospori ovali, cilindrici; pseudomicelii (lanțuri de artrospori) ramificate dicotomic, se fragmentează la nivelul septurilor

Tabelul 9 (continuare)

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
<i>Torulopsis</i>	Colonii albe, gălbui sau brune, cremoase, aderente la mediu, cu margini neregulate, ondulate, concave	Celule ovale sau sferice foarte mici, necapsulate, cu mulți muguri
<i>Criptococcus</i>	Colonii albe-gălbui-brune, convexe, suprafața rugoasă, consistență seroasă sau mucoidă	Lipsit de pseudomiceliu, celule de formă ovală sau sferică, 5–20 microni, înmugurite, cu capsulă gelatinoasă groasă, diferite dimensiuni
<i>Nocardia</i>	Colonii galbene neregulate, glabre, maturizare lentă, devin portocalii, cu margini netede, formă stelată pe agar-sînge	Filamente fine, ramificate neregulate, bacili fini
<i>Actinomyces</i>	Colonii mici, albe-cenușii, netede, se multiplică în condiții de anaerobioză	Filamente fine, cu diametrul de 1 micron, ramificate sau constituind rozete radiare
<i>Hystoplasma</i>	Colonii albe, pufoase sau brune pe mediu cu zaharuri; colonii netede umede, strălucitoare, albe, pe medii cu azot	Filamente subțiri, lungi, chlamidospori echinulați prinși de un pedicul; blastospori unipolari, înmuguriți, sferici sau ovoizi, cu o vacuolă mare
<i>Coccidioides</i>	Colonii albe, pufoase, care prin învechire devin galbene până la roșu-brun, aderente la mediu	Miceliu septat, ramificat, lărgindu-se sub formă de rachetă; artrospori și chlamidospori sferici
<i>Penicillium</i>	Colonii circulare, bine delimitate, suprafața uscată, pulverulentă, albe-verzui, albastre, roșii sau galbene în funcție de specie; pigmentează mediul	Miceliu fin, septat, incolor, din care se formează conidioforul aerian, ramificat, la extremitatea lui se fixează lanțurile de conidii, mici, rotunde, colorate
<i>Mucor</i>	Colonii pufoase, cenușii, flocoase, miceliu aeriene, înalte, invadante	Hife neseptate, simple sau ramificate, lipsite de rizoizi; sporangiu mare, sferic, piriform sau cilindric, încărcat cu spori
<i>Absidia</i>	Colonii albe-vătoase, compacte, aderente, fibroase, invadante	Sporangioforii pornesc din hifele internodale, sporangiul are formă emisferică sau rombică, este lipsit de apofiză, dar este încărcat cu spori incolori
<i>Rhizopus</i>	Colonii pufoase, miceliu aerian invadant, alb-cenușiu, cu puncte dese negre (sporangiofori)	Sporangioforii pornesc din același loc cu rizoizii formînd noduri; sporangii au formă emisferică, sînt așezați pe apofize și au culoare neagră
<i>Sporotrichum</i>	Colonii albe, brune, negre, încrețite, umede sau uscate, pulverulente, cu margini pufoase, suprafața cu zone concentrice	Miceliu subțire, ramificat; conidiofori scurți, au la extremitate sau lateral conidii piriforme, izolate sau un buchet de conidii ovale, rotunde sau cilindrice

Tabelul 9 (continuare)

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
<i>Scopulariopsis</i>	Colonii albe-galbene sau brune, cu suprafața uscată	Conidiofori ramificați neregulat, de care se prind conidiile alungite în formă de alună sau lămie, dispuse în lanțuri, colorate în galben-brun
<i>Alternaria</i>	Colonii albe, pufoase, miceliul bazal se înnegrește formând o membrană densă, pîsloasă. Nu pigmentează mediul	Miceliu septat, incolor; conidiofori simpli sau ramificați, groși, de culoare neagră; conidii negre, alungite piriforme, cu septuri transversale și longitudinale, luînd aspectul de mură
<i>Trichotecium</i>	Colonii mici, roze, dezvoltate radial, cu margini filamentoase, suprafața glabră, ușor lucioasă	Hife septate, conidiofori simpli, conidii incolor eliptice, cu septum transversal, dispuse sub formă de sferule la capătul conidioforului
<i>Chladosporium</i>	Colonii brune-verzui, invadante, cu suprafața ușor ondulată	Hife septate, de culoare brună; conidiile sînt fixate pe conidiofori sub forma unei coroane de copac, sînt uni- sau bicelulare, cilindrice, cu capete rotunjite
<i>Helmintosporium</i>	Colonii albe, pufoase, înalte, invadante, cu miceliu aerian	Hife septate de culoare brună; conidiofori scurți, conidii solitare sau grupate, pluricelulare, septate transversal, alungite, de culoare neagră

4 – Examenul caracterelor biochimice

Testarea caracterelor biochimice este obligatorie pentru identificarea fungilor levuriformi izolați în cultură pură pe medii cu extract de drojdie de bere.

Cele mai utilizate în acest sens sînt:

- testul zimogramei pentru hidrați de carbon
- auxonograma hidraților de carbon (asimilarea zaharurilor)
- auxonograma azotului (asimilarea nitraților)
- testul degradării arbutinei
- dezvoltarea în prezența alcoolului etilic.

Testul zimogramei pentru hidrați de carbon se folosește în scopul diferențierii unor specii de ciuperci levuriforme pe baza capacității lor diferite de a fermenta unele zaharuri (glucoza, galactoza, maltoza, zaharoza, lactoza).

Mediul de cultură utilizat în acest sens este apa peptonată la care se adaugă un indicator (albastru de brom timol, tinctura de turnesol etc.) și, bineînțeles, zaharul de cercetat.

Tehnica de lucru. Se dizolvă 10,0 g peptonă în 1000,0 ml apă distilată și se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în 5 baloane de

200 ml, adăugându-se în fiecare cite unul din zaharuri (4,0 g) și cite 3 ml indicator (10‰) care va colora mediul în roz.

Se repartizează apoi cite 4 ml din fiecare amestec în eprubete de 12/120 mm peste care se toarnă parafină topită (2 părți parafină + 1 parte oleu de parafină) pentru a forma un strat gros de 3—4 mm. Se sterilizează la autoclav la 115°C timp de 20 minute, se lasă să se răcească pînă la temperatura de 50°C și se însămîntează cu cca 1 ml suspensie în ser fiziologic obținută din culturile fungice. Tuburile însămîntate se incubează la termostat la 28°C, prima citire făcîndu-se după 3—4 zile de la însămîntare, iar ultima (cea definitivă) la 21 de zile. În tuburile în care s-a produs fermentarea, dopurile de parafină se ridică de la suprafața mediului datorită formării bioxidului de carbon.

Auxonograma hidraților de carbon (asimilarea zaharurilor). Testarea capacității de asimilare a zaharurilor constituie un alt mijloc de diferențiere a anumitor specii de ciuperci levuriforme.

Mediul utilizat în acest scop este format din:

— agar	20,0 g
— sulfat de amoniu	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,5 g
— fosfat monopotasic	1,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă la cald agarul în 500 ml apă distilată și separat celelalte ingrediente în restul de apă distilată, după care cele două amestecuri se pun într-un singur balon și se sterilizează, timp de 20 minute, la autoclav la 115°C. Se lasă să se răcească pînă la 45°C, după care se adaugă mediului 0,2 ml cultură din mediul lichid cu extract de drojdie de bere. Se repartizează în plăci Petri care se lasă la temperatura camerei pînă a doua zi cînd, pe suprafața fiecăreia, se așază în 5 puncte marginale, marcate, rondele de hîrtie de filtru îmbibate în cite unul din zaharurile de cercetat: glucoză, lactoză, galactoză, maltoză și zaharoză. Plăcile se pun apoi la incubat timp de 1—2 zile la temperatura de 25°C. Dezvoltarea culturii de levuri însămîntate în jurul uneia sau mai multor rondele semnifică asimilarea zaharului respectiv, necesar multiplicării germenului respectiv.

Auxonograma azotului. Pentru testarea capacității de asimilare a compușilor azotați se folosește un mediu compus din:

— geloză	20,0 g
— sulfat de magneziu	0,25 g
— fosfat monopotasic	1,5 g
— biotină	10 ⁻⁸
— tiamină	10 ⁻⁸
— piridoxină	10 ⁻⁶
— acid nicotinic	10 ⁻⁶
— panthotemat de calciu	10 ⁻⁶
— inozitol	10 ⁻⁵
— oligoelemente (soluție Berthelot)	10 picături
— apă distilată	1 000,0 ml

Se procedează de aceeași manieră ca și în cazul auxonogramei hidraților de carbon, înlocuindu-se zaharurile cu diferite surse de azot: peptonă, asparagină, histidină, uree, nitrat de potasiu, sulfat de amoniu etc.

Testul degradării arbutinei. Capacitatea unor levuri de a degrada arbutina în glucoză și hidrochinonă facilitează identificarea acestora. Pentru cultivare se folosește următorul mediu:

- extract de drojdie de bere 1 000,0 ml
- agar 20,0 g
- arbutină 5,0 g

Se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

Mediul se repartizează în plăci Petri în care, în prealabil, s-a pus câte o picătură de clorură ferică — soluție concentrată, care va imprima mediului o culoare galbenă-închisă. După o incubare de 2—6 zile se constată în jurul coloniilor care au degradat arbutina, formarea unui inel de culoare brună-închisă.

Utilizarea alcoolului etilic este un test prin care se diferențiază speciile de levuri care se dezvoltă în prezența alcoolului etilic de cele care sînt inhibitate de acesta.

Se prepară un mediu din:

- fosfat monopotasic 1,0 g
- sulfat de magneziu crist. 0,5 g
- sulfat de amoniu 0,1 g
- apă distilată 1 000,0 ml

Se sterilizează timp de 15 minute la 115°C, se răcește și se adaugă alcool etilic 96° în proporție de 3% și câteva picături de extract de drojdie de bere. După însămînțare, tuburile în care s-a repartizat mediul, se lasă la incubat timp de 1—3 săptămîni. Se pregătește totodată și un set de tuburi martor, conținînd mediu de cultură fără alcool. Tuburile în care s-au dezvoltat fungii în prezența alcoolului se notează cu plus iar celelalte cu minus.

5 — Examenul histopatologic

Este un mijloc indispensabil de diagnostic pentru micozele viscerale.

Recoltarea și prelucrarea probelor de țesuturi și organe se fac prin metodele obișnuite de histologie. În ceea ce privesc tehnicile de colorare, trebuie specificat că evidențierea micetilor în țesuturi necesită metode speciale de colorare, tehnicile obișnuite, respectiv colorația cu hematoxilină-eozină, tricromică etc., avînd o eficiență mai redusă decît în alte cazuri.

Cu rezultate bune se folosesc mai multe metode.

Colorația PAS (după Mc Manus-Mowry, Müller)

Reactivi necesari:

- soluție de acid periodic 1%
- reactiv Schiff
- acid clorhidric 1 n (HCl concentrat cu greutatea specifică 1,19—83,5 ml + apă distilată ad 1000 ml)
- un amestec format din:
 - metabisulfid de potasiu 10% 5,0 ml
 - acid clorhidric 1 n 5,0 ml
 - apă distilată 100,0 ml

Tehnica de colorare: — deparafinarea secțiunilor în xilol

- alcool de concentrații descrescînde
- apă distilată
- acid periodic 1% timp de 10 minute
- spălare în apă de robinet timp de 15 minute
- reactiv Schiff — 10 minute
- spălare în 3 băi succesive de apă sulfuroasă (vezi amestecul de mai sus), cîte 5 minute în fiecare baie
- spălare rapidă cu apă de robinet
- colorare de contrast cu soluție slabă de hemalaun Mayer (30 secunde)
- spălare în apă de robinet — cca 3 minute
- băi de alcool în concentrații crescînde
- xilol
- montare în balsam de Canada

Formațiunile micotice apar colorate în roșu pe un fond albastru-deschis.

Impregnația argentică după Gömöri modificată de Grocott constă în următoarele:

- Deparafinare în xilol
- Hidratare prin băi de alcool de concentrații descrescînde
- Spălare cu apă distilată
- Oxidare cu ajutorul unei soluții de acid cromic 5% timp de 1 oră
- Spălare cu apă
- Tratare cu soluție de bisulfid de sodiu 1% timp de 1 minut (pentru îndepărtarea excesului de acid cromic)
- Spălare cu apă de robinet 5—10 minute
- Spălare cu apă distilată (3—4 băi)
- Tratare cu un amestec preparat ex tempore din următoarele soluții: 5 ml NO_3Ag 5% + 100 ml metenamină 3% (precipitatul alb care se formează dispare prin agitare); din această soluție se iau 25 ml care se diluează cu 25 ml apă distilată și în momentul folosirii se adaugă 2 ml dintr-o soluție de borat de sodiu 5%; lamele se iversează în băile cu această soluție timp de 30—60 minute la 58—60°C pînă la apariția culorii galbenă-brună; prin examinare la microscop se verifică intensitatea colorației, elementele micotice devenind brune-închis (manipularea lamelor se va face cu ajutorul unor pense de material plastic sau a unor pense parafinate).
- Spălare succesivă în 6 băi de apă bidistilată
- Tratare cu soluție de clorură de aur 0,1% timp de 2—5 minute
- Spălare cu apă bidistilată
- Fixarea argintului într-o soluție de thiosulfat de sodiu 2% timp de 2—5 minute
- Spălare cu apă de robinet
- Spălare cu apă acetică 1/500
- Colorare de fond cu hemalaun (hematoxilină-eozină-safran) sau cu verde de lumină (0,2% în apă acetică)
- Tratare cu carbonat de litiu
- Spălare cu apă

— Deshidratare prin băi de alcool de concentrații crescînde pînă la alcool absolut

— Clarificare în xilol

— Montare în balsam

Rezultate: dacă colorarea s-a făcut corect, pereții ciupercilor apar colorați intens pînă la negru, mucina în gri-pal, iar interiorul miceliului în roz-decolorat, pe un fond albastru sau verde, în funcție de colorația de contrast utilizată.

Metode de colorare vitală. Sînt mult mai rar folosite.

Constau în inocularea la animalul viu a unor substanțe colorante netoxice, care au proprietatea de a se fixa în anumite celule sau țesuturi.

După un anumit interval de timp se efectuează biopsii, urmate de examinarea secțiunilor histologice.

Metode de colorare postvitală. Se fac în prealabil biopsii, după care materialul obținut se prelucrează imediat histologic, colorîndu-se cu un colorant vital.

Cu ajutorul acestei metode se urmărește punerea în evidență a unor modificări morfologice și structurale ale organitelor celulare, condiționate de prezența unor fungi sau a produselor elaborate de aceștia.

Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micotoxicozelor

Micotoxicozele animalelor sînt boli produse de acțiunea toxinelor elaborate de către fungii patogeni sau condiționat patogeni care se dezvoltă în furaje. Ca urmare, precizarea diagnosticului de micotoxicoză se va face prin examinarea furajelor care au constituit hrana animalelor îmbolnăvite.

Recoltarea, ambalarea și transportul probelor de furaje

De modul în care se face recoltarea, ambalarea și transportul probelor de furaje în vederea examenelor de laborator, depinde în foarte mare măsură stabilirea corectă a diagnosticului.

Probele de furaj trebuie să fie cît mai reprezentative, în sensul de a oferi modificări organoleptice care să justifice suspiciunea de furaj toxic.

În acest sens, recoltarea se va face după cum urmează:

— pentru fibroase, se recoltează din mai multe puncte ale stocului, o cantitate totală de cca 5 kg pentru fiecare 25 tone de furaj, care se amestecă, făcîndu-se o probă medie, din care se expediază laboratorului o cantitate de 1 kg. Din porțiunile furajului-stoc, care prezintă modificări organoleptice pregnante, se recoltează separat alte probe care vor fi transportate la laborator cu mențiunea respectivă. Probele se ambalează în saci care se închid și se marchează printr-un indicativ pe baza căruia să poată fi identificate;

— pentru furajele combinate și grăunțe se face, de asemenea, o probă medie de amestec de cca 10 kg din care se trimite la laborator 1 kg. Acestea se ambalează în pungi de material plastic sau borcane de sticlă cu capac etanș, notîndu-se pe fiecare proveniența;

— din silozuri, se recoltează cu sonda din mai multe puncte, în diagonală, la distanță de 2—3 m și la o adîncime de 50—100 cm;

— pentru furajele verzi, se examinează mai întîi pășunea, după care se vor recolta plantele cu modificări suspecte de a fi de natură micotică. Este bine ca în prealabil aceste plante să fie uscate și după aceea expediate la laborator, pentru a le asigura o cît mai bună conservabilitate în timpul transportului. Ele se ambalează dacă este posibil individual, în hîrtie albă, curată.

Toate probele de furaje vor fi însoțite de note explicative referitoare la proveniență, data și modul de recoltare, condițiile în care a apărut intoxicația și la ce efectiv, date anamnetice privind manifestările clinice ale bolii.

Investigațiile de laborator trebuie să cuprindă examenele descrise în continuare.

1 – Examenul organoleptic

Se examinează în acest sens aspectul, culoarea, mirosul, consistența furajului, urmărindu-se totodată și prezența sau absența formațiunilor micotice, notându-se amănunțit rezultatele examenului.

2 – Examenul microscopic direct

Urmărește să stabilească prezența ciupercilor în furaj, precum și gradul de contaminare a furajului.

În acest scop, probele de furaje se examinează mai întâi sub lupă, pentru a se stabili existența florei micotice și totodată pentru a se putea alege porțiunile de furaj contaminate.

Se raclează apoi cu ajutorul unui bisturiu steril formațiunile micotice de pe suprafața și din interiorul furajului, raclatul obținut punându-se pe lame, împreună cu câteva picături de apă distilată sau hidrat de sodiu sau potasiu 20‰; se acoperă cu o lamelă fină și se examinează la microscop.

O altă parte din aceeași probă se pune într-un vas de sticlă cu apă distilată, se agită temeinic pentru a spăla cât mai bine furajul, se lasă să sedimenteze sau se centrifughează și, după îndepărtarea supernatantului, se examinează la microscop sedimentul între lamă și lamelă. În acest fel, se poate aprecia global și gradul de contaminare a probei. Pentru precizie se poate recurge la numărătoarea sporilor în camera Thoma.

Această primă apreciere a gradului de contaminare, care este totuși subiectivă, trebuie urmată de un examen cultural cantitativ. Acesta este indispensabil mai ales pentru furajele combinate, făinuri etc. la care din cauza măcinării, structurile formațiunilor micotice se denaturează și, ca urmare, examenul microscopic direct nu oferă posibilitatea unei aprecieri corespunzătoare.

3 – Examenul cultural cantitativ

Se ia o cantitate de 5 g din proba medie de furaj, se macină bine și se amestecă cu 74 ml soluție fiziologică și 1 ml laurisulfonat de sodiu 1‰.

Suspensia obținută se pune într-un triturator, timp de 30 secunde la o turație de 12 000 t/minut.

Se adaugă apoi 20 ml soluție de carboximetilceluloză 35% și se omogenizează din nou în triturator, timp de 1 minut la aceeași turație, obținându-se în acest fel o suspensie 1 : 20.

Din această suspensie se fac diluții zecimale succesive într-un amestec de soluție fiziologică și carboximetilceluloză 2%, pînă la diluția 1/200 000.

Se însămînțează cîte 1 ml din fiecare diluție, în 4 plăci Petri cu diametrul de 10,5 cm, în care s-au pus în prealabil cîte 15 ml mediu de cultură topit și răcit pînă la 45°C, avînd grijă ca fiecare tub să fie bine agitat înainte de însămînțare, pentru omogenizarea suspensiei. Mediul însămînțat se amestecă cu suspensia de furaj adăugată, prin înclinări repetate ale plăcilor, și se lasă să se solidifice la temperatura camerei. Plăcile sînt apoi așezate cu capacul în jos într-un termostaț la 25°C.

Prima citire se face la 12 ore și ea se va continua zilnic timp de o săptămînă, notîndu-se de fiecare dată numărul de colonii care s-au dezvoltat în plăci și calculîndu-se, în final, după numărul mediu de colonii, numărul de spori de miceti care revin la 1 g de furaj. Cantitățile maxime de spori de miceti pe un gram de furaj sînt: pentru cereale — 500 000, nutrețuri combinate — 300 000, făinuri și concentrate proteice — 10 000. Se consideră în general că o medie de 10 000—320 000 colonii/gram de furaj, denotă un grad de contaminare suficient de mare pentru a fi în măsură să incrimineze furajul respectiv drept cauză a manifestărilor toxice la animalele care l-au consumat.

4 – Examenul cultural calitativ

Se face cu scopul izolării în culturi pure a micetilor din furaje, pe baza cărora să se poată face identificarea acestora.

Cele mai bune condiții de cultivare a fungilor din furaje și care permit totodată elaborarea micotoxinelor, le oferă mediile naturale (cartof, morcov, sfeclă) și mediile artificiale, care, pe lîngă geloză, conțin și un produs natural (făină de cereale, extract de cartofi, morcovi etc.).

Pregătirea mediilor naturale este extrem de simplă: se taie porțiuni adecvate ca formă eprubetelor în care se introduc, se sterilizează la autoclav 30 minute și se însămînțează.

Cu rezultate bune se poate folosi și mediul Czapeck.

Se poate adăuga mediului de cultură 20 U.I./ml penicilină și 40 micrograme/ml streptomycină, cu scopul de a evita dezvoltarea florei bacteriene de asociație.

Pregătirea materialului în vederea însămînțării lui pe medii de cultură constă în:

— fragmentarea foarte mărunță a furajelor consistente, grosiere, contaminate;

— semințele se pot depune ca atare pe suprafața mediului de cultură solid, sau se pot fragmenta; pentru izolarea fungilor din profunzimea semințelor se raclează conținutul acestora pe mediul de cultură;

— furajele combinate se împrăstie în strat subțire, în cantitate redusă, pe o coală albă de hîrtie, ridicîndu-se apoi cu o ansă umectată din porțiunile care prezintă modificări organoleptice.

Însămînțarea materialului se face după regulile cunoscute, respectându-se condițiile de sterilitate. Materialul se depune cu ajutorul ansei în puncte diferite, distanțate, pe suprafața mediului, astfel încât coloniile ce vor rezulta să fie izolate și să nu necesite, în consecință, pasajul lor ulterior. Din fiecare probă se însămînțează cel puțin 2 tuburi sau plăci. O serie de tuburi se incubează la temperatura camerei, iar cealaltă (corespondentă) la termostat la 28°C.

Examinarea macroscopică a culturilor trebuie făcută zilnic, notându-se amănunțit toate caracterele culturii. Ea trebuie însoțită periodic și de examenul microscopic al unor mici porțiuni detașate din colonii, pentru înregistrarea detaliilor de structură microscopică a fungilor respectivi, pe baza cărora se va face încadrarea sistematică a acestora (familie, gen, specie), uzînd de determinatoarele micologice.

În cazul în care pe un mediu s-au dezvoltat mai multe tipuri de colonii este necesar ca acestea să se izoleze pe medii separate pentru obținerea coloniilor pure.

Examenul morfo-cultural al fungilor se mai poate practica și cu ajutorul microculturilor efectuate pe lame. Acesta are avantajul de a permite efectuarea unui examen micologic complet fără deteriorarea coloniilor de muceți. În acest sens se pot folosi metodele descrise în continuare.

Metoda Van Fieghen folosește inele de sticlă cu diametrul de 2 cm și înălțimea de 1 cm, care se imersează cu ajutorul unei pense sterile în parafină topită. Se așază apoi imediat inelul la mijlocul unei lame de microscop sterile și în mijlocul lui se pune puțină apă sterilă.

Se iau lamele fine, se flambează și în mijlocul lor se pune cu ajutorul unei pipete Pasteur o picătură de mediu de cultură lichid în care se va însămînța o cantitate foarte mică din materialul de cercetat. Se unge marginea superioară a inelului de sticlă cu lanolină, se flambează trecînd cu o flacăra peste el și se aplică apoi lamela cu picătura însămînțată în jos. După cîteva zile de incubație, se examinează la microscop.

Metoda culturii pe lamelă geloată este asemănătoare cu precedenta, fiind însă superioară acesteia, prin faptul că permite examinarea culturii în dezvoltare cu un obiectiv puternic al microscopului.

Se lipește cu lanolină un inel de sticlă pe o lamă de microscop. Se gelozează apoi una din fețele unei lamele sterilizate ținută orizontal (pentru manevrare lamela se înfige cu un colț într-un bloc de plastilină), turnînd geloza topită cu ajutorul unei pipete Pasteur. După răcire, se însămînțează o cantitate mică de cultură în mijlocul lamelei cu ajutorul unei anse. Se unge cu lanolină sterilă marginea superioară a inelului de sticlă, iar în spațiul delimitat de acest inel pe lamă, se pune puțină apă distilată. Se așază apoi lamela cu fața geloată (însămînțată) în jos, pe marginea superioară a inelului. Se pune la incubat și se examinează zilnic, urmărindu-se astfel dezvoltarea culturii pe tot parcursul său.

5 – Testarea micotoxiciții probelor de furaje

Simpla identificare a ciupercilor în furaj, chiar în condițiile unui grad mare de contaminare (a cărui apreciere rămîne totuși subiectivă din cauza dificultăților de obținere a unor suspensii perfect omogene),

nu oferă suficiente argumente pentru a se considera că ele au fost cauza îmbolnăvirii animalelor și, ca urmare, nu poate îndreptăți scoaterea furajelor respective din alimentația animalelor. Certitudinea asupra acestui fapt se poate obține numai prin testarea toxicității lor pe animale de laborator, alegându-se în acest scop specii cunoscute ca fiind cele mai receptivă față de una sau alta din speciile de fungi a căror toxicitate trebuie testată. Micotoxicitatea furajelor poate fi determinată prin diferite procedee. Unul dintre acestea constă în administrarea în hrana unor animale de laborator a unei cantități din furajul provenit din stocul în care au fost identificați fungi.

Reproducerea bolii la animalele de experiență confirmă faptul că tulburările semnalate la animalele îmbolnăvite în urma consumului de asemenea furaje se datoresc intoxicației micotice.

Un alt procedeu de testare constă în inocularea la șoareci a micotoxinelor extrase din furajele contaminate cu muceți.

Metoda este bineînțeleasă mai laborioasă, prin tehnica de extracție a toxinelor din ciuperci, dar rezultatele par să fie mai sigure și se obțin mai rapid.

Extracția micotoxinelor din furaje se face cu ajutorul aparatului Soxhlet, la cald.

Tehnica de lucru. Se macină foarte bine 200 g din proba de furaj de examinat care se fracționează apoi în 2 părți egale, respectiv a câte 100 g fiecare.

Într-un cartuș confecționat din hîrtie de filtru (pe măsura extractorului) se ambalează una din aceste probe, se introduce cartușul în extractor, după care se pun în balon cca 400 ml eter etilic. După reglarea băii de apă la 40°C, se acționează sistemul de răcire prin deschiderea robinetului, astfel ca apa să ajungă prin furtun la refrigerent. Extracția durează 5—7 ore.

Se procedează asemănător și cu cea de a doua probă de 100 g, extracția făcîndu-se cu cloroform, la o temperatură mai mare, respectiv 65°C.

După terminarea extracției, cînd temperatura apei din baia marină este egală cu cea a camerei, se trece conținutul balonului într-un creuzet de porțelan, așezat pe o baie de nisip încălzită electric pînă la temperatura de 60°C. Se lasă să se evapore soluția extractantă, pînă cînd în creuzet rămîne o substanță cu consistență cleioasă. După ce a dispărut complet mirosul substanței de extracție (eter, cloroform), în fiecare creuzet se pun cîte 20 ml ulei rafinat de floarea-soarelui (care în prealabil a fost filtrat și sterilizat) sub amestecare continuă cu pistilul unui mojar.

Se obține în acest fel o suspensie uleioasă din care se vor face inoculări la șoareci. În acest scop, se fac 3 loturi de șoareci în vîrstă de 30 de zile și cu o greutate individuală de 18 g, fiecare lot fiind compus din minimum 3 animale.

Șoarecilor din primul lot li se vor inocula 0,5 ml/cap, celor din lotul al doilea cîte 1 ml/cap, în timp ce la șoarecii martor se inoculează pe aceeași cale, 1 ml din uleiul folosit ca vehiculant.

Începînd cu următoarea zi de după inoculare, se urmărește starea clinică a șoarecilor, înregistrîndu-se mortalitatea și timpul scurs de la inoculare și pînă în momentul morții animalelor.

Interpretarea rezultatelor:

— se apreciază ca netoxice furajele din al căror extract a fost inoculată doza de 1 ml și nu a omorât șoarecii în decurs de 3 zile de la inoculare;

— se consideră toxice furajele al căror extract omoară șoarecii inoculați cu cantitatea de 1 ml, dar nu și pe cei inoculați cu 0,5 ml, în timp de 1—2 zile;

— furajele sînt foarte toxice, dacă extractul lor omoară șoarecii inoculați cu 0,5 ml și 1 ml în decurs de 1—2 zile de la inoculare.

Testul dermonecrotic. Gradul de toxicitate a extractelor de nutrețuri contaminate cu mîceți se poate determina și prin metoda cutanată la iepuri sau șoareci albi.

După depilarea unei zone din regiunea dorsală, se aplică extractul pe pielea ușor scarificată, urmărindu-se modificările locale care apar, pe baza cărora furajele vor fi încadrate ca:

— foarte puțin toxice (gradul I de toxicitate) cînd animalele prezintă un ușor eritem și sensibilitate crescută;

— puțin toxice (gradul II de toxicitate) dacă reacțiile locale se reduc la eritem, sensibilitate crescută, vezicule și ușoară îngroșare a pielii;

— toxice (gradul III de toxicitate) la formarea eritemului, veziculelor, a unor ulcere și cruste, însoțite de sensibilitate crescută;

— foarte toxice (gradul IV de toxicitate) cînd animalele prezintă local sensibilitate crescută, eritem, vezicule, necroze și ulcere profunde ce cuprind și țesuturile subdermice.

Testarea micotoxiciții pe mormoloci de broască. Se folosesc mormoloci de broască în vîrstă de 2 săptămîni. În acest scop, se recoltează ouă de broască care se repartizează în vase mari de sticlă, în apă de robinet amestecată cu apă de baltă. După eclozionare, mormolocii se trec în vase cu apă de robinet (care trebuie schimbată zilnic), notîndu-se data eclozionării. Ca hrană, se administrează mormolocilor pînă la vîrsta de 2 săptămîni, salată verde proaspătă, fiartă și răcită. În timpul experimentului, hrana se suprimă.

Extractele probelor se pun în pahare Berzelius și se evaporă pînă la uscare. Se adaugă apoi 1—2 ml de alcool etilic și 10 ml apă de robinet, se așază amestecul în baia marină pentru evaporarea alcoolului, după care se completează cu apă pînă la un volum care să asigure 10 ml soluție/cap de mormoloc.

Separat, se amestecă 1—2 ml alcool și 10 ml apă, se evaporă alcoolul, se completează cu apă și se introduc mormolocii martori.

Se urmăresc rezultatele la 24, 48 și 72 ore, notîndu-se mormolocii morți la aceste intervale.

Din a 3-a zi de experiență, mormolocii pot primi hrană.

După 3—5 zile de la începutul experimentului, mormolocii care supraviețuiesc se scot din soluția cu toxină și se trec în vase cu apă de robinet, urmărindu-se în continuare modificările care apar în metamorfoza lor față de a celor martori.

Folosirea ouălor embrionate de găină se bazează pe acțiunea toxică a extractelor inoculate în camera de aer. Prin această metodă se poate calcula și DL_{50} în micrograme/ou și coeficientul de toxicitate a diferitelor micotoxine cercetate. Dintre acestea, aflatoxina B_1 pare a fi cea mai toxică pentru ouăle embrionate.

Folosirea protozoarelor. Dintre protozoare, *Paramaecium caudatum* este cel mai frecvent folosit în acest scop. Testarea se face prin amestecarea extractelor suspecte de a conține micotoxine, cu culturi de protozoare în eprubete, pe lame escavate sau lame obișnuite, urmărindu-se apoi la microscop efectul asupra mobilității și aspectului protozoarelor.

Folosirea culturilor celulare presupune utilizarea unor culturi de celule sensibile (celule renale de vițel în vîrstă de 14—16 săptămîni, în cultură primară). Inocularea se face la 7—8 zile de incubație la 37°C staționar, după care se urmărește apariția efectului citotoxic, apreciindu-se procentul de celule distruse și modificările morfologice care se instalează.

Asupra acestor din urmă metode nu au fost date detalii de tehnică, ele fiind mai pretențioase și ca urmare mai greu de aplicat în orice laborator.

Un examen micologic al furajelor trebuie să includă mai multe mijloace de diagnostic din cele menționate și numai prin corelarea rezultatelor obținute la fiecare testare să se tragă concluzia finală referitoare la toxicitatea sau netoxicitatea furajului examinat, luîndu-se în consecință măsurile cele mai corespunzătoare de combatere și prevenție.

Determinarea sensibilității fungilor față de acțiunea micostaticelor (antimicograma)

Tehnica de lucru este asemănătoare celei utilizate pentru antibiogramă, folosind însă pentru însămînțări mediul PC (macerat de cartofi și morcovi). Se însămînțează suspensia de cercetat, se lasă să se usuce suprafața mediului, după care se depun pe suprafața acestuia micocomprimate sau rondelile de hîrtie de filtru îmbibate cu diverse micostatice: Nistatin, Amphotericină B, Griseofulvină, Micostatin, Sulphamethoxypiridozină, Sulphydiazină, Piramicin, Candicidină etc.

Pentru solubilizarea substanțelor micostatice, în vederea îmbibării rondelilor de hîrtie de filtru, se folosește metanol într-o anumită concentrație pentru fiecare substanță în parte.

Interpretarea se face ca și în cazul antibiogramei la bacterii.

Termeni micologici folosiți frecvent (după G. R. Carter, 1973)

- Artrospor = spor asexuat, format prin fragmentarea miceliului. Exemplu: *Geotrichum candidum*.
- Ascospor = spor sexual caracteristic pentru levurile adevărate și ascomicete. Sînt produși într-o formațiune asemănătoare unui sac numit ască. Ascosporul rezultă din fuziunea a doi nuclei. Exemplu: *Saccharomyces spp.*, *Nannizzia spp.*
- Asca = structură caracteristică specializată, în formă de sac la levurile adevărate la care se constituie ascospori. Exemplu: *Saccharomyces spp.*
- Blastospor = spor format ca rezultat al procesului de înmugurire pe traiectul miceliului sau dintr-un singur spor. Exemplu: *Saccharomyces spp.*, *Candida spp.*
- Chlamydospori = spori rezistenți, cu peretele gros, formați direct prin diferențierea hifelor. Exemplu: *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*.
- Columella = partea superioară a sporangioforului, în formă de cupolă. Exemplu: *Mucor spp.*

Conidie	= spor asexuat format prin strangularea hifei, înmugurire sau diviziune septală. Exemplu: <i>Penicillium spp.</i>
Conidiofor	= o ramură a miceliului, în formă de pețiol, pe care se dezvoltă conidiile izolate sau în număr mai mare. Exemplu: <i>Penicillium spp.</i>
Dermatiaceous	= acest termen se folosește pentru a desemna ciupercile brune-închise sau negre. Exemplu: <i>Phialophora spp.</i> , <i>Hormodendrum spp.</i>
Dimorf	= au două forme sau faze, exemplu forma levuriformă și forma miceliană. Exemplu: <i>Blastomyces dermatitidis</i> .
Endogen	= își au originea sau sînt produse din interior. Exemplu: infecțiile cu <i>Candida albicans</i> obișnuit sînt considerate endogene.
Exogen	= își au originea din afară. Exemplu: infecțiile cu <i>Histoplasma capsulatum</i> .
Ectothrix	= artrosporii apar la exteriorul firului de păr. Exemplu: <i>Microsporum spp.</i>
Endothrix	= artrosporii apar în interiorul firului de păr. Exemplu: <i>Trichophyton spp.</i>
Geofil	= desemnează fungi al căror habitat natural este solul. Exemplu: <i>Coccidioides immitis</i> .
Germeni tubulari	= structură asemănătoare unui tub, produsă prin germinarea sporilor. Se dezvoltă formînd hife. Exemplu: <i>Candida albicans</i> .
Glabru	= forma netedă. Exemplu: forma glabră de la <i>Geotrichum candidum</i> .
Hifă	= filamentele care constituie corpul talului unei ciuperci.
Hife în formă de rachetă	= hife cu segmentul terminal tumefiat, constituind o formațiune asemănătoare cu o rachetă de tenis. Exemplu: <i>Dermatophytes</i> .
Levuri	= fungi unicelulari care se reproduc prin înmugurire asexuată sau prin ascospori produși sexual. Exemplu: <i>Saccharomyces spp.</i>
Macroconidii	= spor mare, uneori multiceular. Exemplu: <i>Dermatophytes</i> .
Microconidii	= conidii mici, unicelulare, formate lateral pe hife. Exemplu: unele specii de <i>Microsporum</i> și <i>Trichophyton</i> .
Miceliu	= strat format din împletirea hifelor.
Nod	= punctul din stolon din care pornesc rhizoizii. Exemplu: <i>Rhizopus spp.</i>
Pseudohife	= filamente constituite din prelungirea celulelor înmugurite, care nu s-au detașat. Exemplu: <i>Candida albicans</i> .
Rhizoid	= hife ramificate, asemănătoare rădăcinilor, care se extind în mediu. Exemplu: <i>Absidia spp.</i>
Septat	= hifele au pereți transversali sau septumuri.
Sporangiu	= o structură închisă, adesea sferică, în care se formează spori asexuați, prin clivare. Exemplu: <i>Rhizopus spp.</i>
Sterigma	= structuri specializate, scurte sau alungite, prinse de o veziculă și care produc conidii. Exemplu: <i>Aspergillus spp.</i>
Stolon	= o hifă orizontală care formează lăstari în locurile unde atinge substratul, dînd naștere la rizoizi. Exemplu: <i>Absidia spp.</i>
Zygospor	= spor sexual, cu perete gros, la fungii adevărați, care rezultă din fuziunea a 2 gametangii similare. Exemplu: <i>Phycomycetes</i> .

Conservarea microorganismelor și a unor materiale biologice

Conservarea culturilor microbiene sau a sușelor virale izolate din diferite procese patologice sau din mediul ambiant este necesară atât pentru păstrarea colecțiilor, cât și pentru lucrările curente de investigare a însușirilor lor biologice. În studiile de tipizare, clasificare și comparare a acestor însușiri, este nevoie de conservarea îndelungată a proprietăților tulpinilor respective, ceea ce este posibil numai în anumite condiții. Este necesar să se țină cont în aceste lucrări de câțiva factori esențiali:

- o temperatură optimă de conservare pentru fiecare specie;
- o umiditate convenabilă pentru a evita deshidratarea mediilor de cultură;
- o luminozitate redusă;
- un mediu de cultură convenabil, care să asigure o longevitate maximă.

Temperatura optimă pentru conservarea microorganismelor este variabilă cu specia. Există unele specii care se conservă de preferință la temperatura camerei (*Pasteurella*, *Corynebacterium*, micobacteriile etc.), în timp ce altele (listeriile, bacilul rujetic, stafilococii) se păstrează mai bine la temperaturi scăzute. În acest din urmă caz, se poate recurge la temperaturile realizate de frigiderile obișnuite ($+4^{\circ}\text{C}$) sau la congelări sub 0°C (-20°C — -90°C) folosindu-se congelatoare speciale. Durata conservării este în principiu cu atât mai mare cu cât temperatura este mai joasă. Așa, de exemplu, dacă în cazul germenilor care se țin la temperatura camerei este necesară pasarea periodică a tulpinilor la intervale variabile cu viabilitatea lor, în cazul congelării lor se pot conserva în cele mai multe cazuri luni, sau chiar ani. O condiție importantă în cazul conservării prin congelare este să nu se producă decongelări și re-congelări.

Umiditatea convenabilă este realizată, în cazul bacteriilor, prin folosirea unor medii corespunzătoare și împiedicarea deshidratării lor. Pentru a evita uscarea mediilor este necesară închiderea cât mai etanșă a recipientelor în care se găsesc culturile respective. Metodele mai frecvent folosite pentru închiderea tuburilor sînt următoarele:

- închiderea la flacără, care realizează o etanșeizare perfectă și sigură, dar presupune o dotare corespunzătoare, iar la deschidere se întâmpină anumite dificultăți;

— închiderea prin parafinare: în acest scop dopul de vată se înfundă pînă la nivelul gurii tubului și se impregnează apoi cu parafină topită, aspirată într-o pipetă. Etanșeizarea nu este adesea perfectă așa încît nu asigură întotdeauna evitarea deshidratării. La deschidere se recurge la încălzirea tubului și scoaterea dopului cu o pensă sau cel mai bine, cu un cîrlig special în formă de tirbușon cu o singură ansă, care se înșurubează ușor în dopul parafinat;

— închiderea cu dopuri de cauciuc, obișnuite sau speciale, se face după ce în prealabil dopul de vată a fost împins în interiorul tubului. Este bine ca dopurile de cauciuc să fie sterilizate în prealabil prin fierbere sau, preferabil, prin autoclavare în plăci Petri de dimensiuni mai mari, unde ele se aranjează pe unul sau mai multe rînduri în funcție de înălțime (este mai recomandabil un singur rînd, pentru a evita lipirea dopurilor între ele). Fixarea lor la eprubete se face în boxa sterilă, la flacără, luîndu-se toate măsurile de precauție și în special temeinica flambare a părții superioare a dopului de vată și a gurii tubului (după flambare este necesar ca tubul să se răcească pentru a preîntîmpina topirea cauciucului și aderența la pereți). Există dopuri speciale care, pe lîngă partea destinată a intra în interiorul tubului, au și o buză externă care îmbracă marginea acestuia, realizînd o etanșeizare mai bună;

— închiderea cu dopuri de plută sterilizate: stratul superficial al dopului de vată, care depășește gura tubului se arde la flacără, se împinge cu o pensă spre interiorul tubului și se pune dopul de plută. Etanșeizarea nefiind absolută, se înțelege că în timp se produce deshidratarea lentă a conținutului;

— închiderea cu bandă de leucoplast este ca și precedenta imperfectă și poate fi folosită doar cu titlu de provizorat. În plus, ea nu fereste culturile de infestare cu ciuperci;

— astuparea cu o rondelă de sticlă după înfundarea dopului de vată: fixarea se face cu un strat gros de gelatină glicerinată. După uscare se acoperă totul cu un strat de lac. Metoda este greoaie;

— sigilarea cu ceară, pe lîngă că nu asigură o etanșeizare perfectă, este și greu de manevrat ulterior, la desfacere.

Evitarea uscării mediilor în scopul conservării culturilor bacteriene se poate realiza și prin metoda DARANEY, prin care germenii se înșămîntează pe un mediu solid, ușor înclinat, astfel încît unghiul pe care-l formează mediul față de pereții eprubetei să nu depășească 45° . După dezvoltarea culturii aceasta se acoperă cu parafină lichidă sterilă. Stratul de parafină trebuie să depășească cu cîțiva milimetri limita superioară a mediului.

S-a observat că unele specii se pot conserva foarte bine păstrîndu-și toate însușirile caracteristice speciei, prin uscare. Aceasta se poate realiza, fie la temperaturi peste 0°C , fie la temperaturi joase.

Uscarea la peste 0°C se practică mai des pentru speciile bacteriene sporulate. În acest scop, se introduc în cultură fire de mătase sau bu-

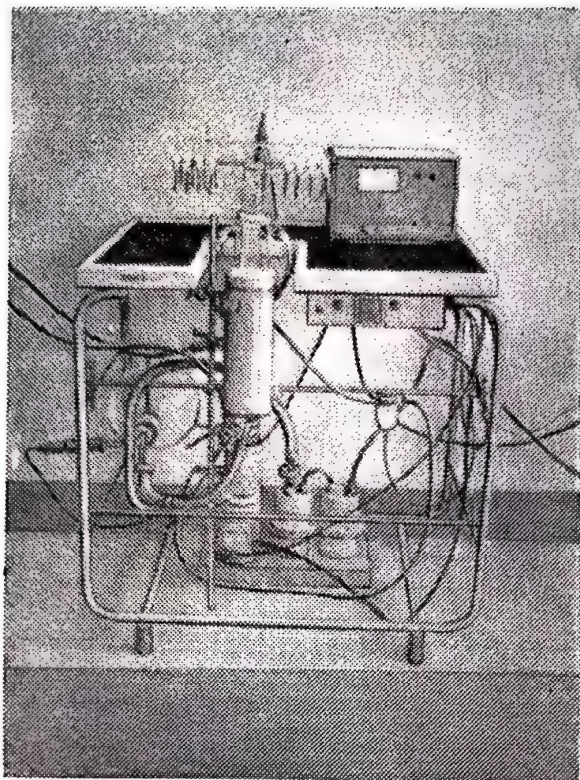


Fig. 154 — Aparat de liofilizat de capacitate mică

cățele de burete sterile, care apoi se usucă prin evaporare lentă, la exicator sau în vid, în aer steril. Se pot folosi ca suport pentru spori și nisipul sau pământul sterilizat în prealabil.

Uscarea la temperaturi joase este cuplată de cele mai multe ori cu folosirea vidului, purtând denumirea de *liofilizare*. Această metodă este la ora actuală una din cele mai larg folosite, atât pentru suspensii bacteriene, virale sau de altă natură, cât și pentru alte produse biologice (vaccinuri, seruri, proteine etc.). Liofilizarea se realizează cu ajutorul unor aparate speciale, mai mult sau mai puțin complexe, dar care trebuie să permită, în principiu, deshidratarea în condiții de presiune negativă, de temperatură cât mai joasă și de sterilitate. Pentru liofilizare se folosesc fiole sau flacoane speciale, sterile, care pot fi închise e-

tanș la terminarea operațiunii. „Vidul” se realizează cu ajutorul unor pompe de vacuum, care funcționează pe toată durata liofilizării, realizând de fapt deshidratarea materialului respectiv și eliminarea vaporilor. Temperatura scăzută se realizează, fie cu ajutorul unor recipiente cu gheață carbonică, în care fiolele sau flacoanele sînt puse, fie prin simplul proces de evaporare, care, decurgînd cu absorbție de căldură, determină automat scăderea temperaturii și prin condensarea vaporilor din atmosferă, formează un strat de gheață ce se menține pe tot parcursul liofilizării. Congelarea este necesară pentru ca deshidratarea să se producă lent și progresiv. După terminarea procesului (indicat, fie de dispozitive speciale, fie de desprinderea stratului de gheață de pe pereții externi ai fiolelor), fiolele se închid (cu ajutorul flăcării, preferabil cu oxigen) și se controlează apoi vidul din interior, folosindu-se dispozitive speciale cu curenți de înaltă frecvență (pentru buna conservare a materialului liofilizat este nevoie de vid în fiole).

Fiolele cu materiale biologice liofilizate se păstrează în general, la frigider ($+4^{\circ}\text{C}$) sau la congelator (sub 0°C).

Luminozitatea redusă, preferabil întuneric total, este necesară pentru o bună conservare, deoarece se evită acțiunea nocivă a radiațiilor luminoase și contribuie la sistarea proceselor vitale. În acest scop, se recurge la camere întunecoase (camuflante) dulapuri, frigidere sau congelatoare, în funcție de temperatura la care culturile respective se păstrează.

Mediile de cultură optime pentru conservarea tulpinilor bacteriene diferă cu specia (tabelul 10).

Tabelul 10

Medii de cultură pentru conservarea bacteriilor

Nr. crt.	Genul sau specia bacteriană	Mediul optim pentru conservare	Temperatura optimă (°C)	Intervalul optim de transplantare
1	<i>Actinobacillus lignieresii</i>	Bulion	+18	10 zile
2	<i>Actinobacillus mallei</i> , <i>Brucella</i>	Cartof glicerinat	+18	30 zile
3	<i>Bacillus</i>	Agar înclinat	+18	cîțiva ani
4	<i>Clostridium</i>	Geloză Veillon	+18	cîțiva ani
5	<i>Corynebacterium</i>	Bulion sau bulion cu ser în funcție de specie	+18	30—60 zile
6	<i>Erisipelothrix</i> , <i>Listeria</i>	Bulion	+4	60 zile
7	<i>Leptospira</i>	Mediul Korthoff	+18	14—20 zile
8	<i>Mycobacterium</i>	Mediul Löwenstein-Jensen sau cartof glicerinat	+18	90 zile
9	<i>Necrobacterium necrophorum</i>	Bulion cu carne și ser	+18	6 zile
10	<i>Pasteurella multocida</i>	Bulion	+18	30 zile
11	Stafilococi și colibacili, salmonelle, proteus	Agar moale	+4	90 zile
12	Streptococi	Bulion cu ser	+4	30 zile

Conservarea unor culturi microbiene inactivate

Se poate realiza cu ajutorul formolului, care pe lîngă că inactivează cultura în cauză, o ferește de contaminarea cu germeni nedorîți din mediul ambiant. Se folosesc mai multe posibilități.

— În cazul culturilor în tuburi, se poate îmbiba partea inferioară a dopului de vată cu formol, după care se astupă cu el tubul cu cultură. Germenii sînt inactivați în decurs de 24—48 de ore.

— În cazul culturilor în plăci Petri, se îmbibă o bucată de hîrtie de filtru în formol și se așază în interiorul capacului. După două zile se scoate hîrtia și se etanșează capacul plăcii cu parafină.

— Se poate recurge, în cazul suspensiilor bacteriene și la adăugarea de formol în proporție de 0,1—0,2%.

Conservarea virusurilor

Un diagnostic corect al diferitelor infecții virale, precum și o identificare corespunzătoare a agenților virali în cauză, este strâns legată și de o bună conservare a materialului infecțios în care aceștia se găsesc. În acest sens au fost aplicate în timp o serie de modalități, dintre care unele sînt azi mai puțin folosite în timp ce altele au devenit indispensabile. Astfel, dacă conservarea prin treceri succesive pe animale sensibile este un procedeu de excepție, conservarea prin congelare și liofilizare sînt mijloace cotidiene în majoritatea laboratoarelor de specialitate.

Conservarea prin congelare este frecvent folosită în special pentru materialele infecțioase care urmează a fi inoculate (probe de materii fecale, fragmente de organe virulente) ca și pentru păstrarea diferitelor tulpini virale, necesare trecerilor ulterioare. Temperaturile de minus 20—30°C necesare în acest scop se pot obține fie prin congelatoare speciale, fie cu ajutorul gheții carbonice și alcoolului, menținute în vase Dewar de 5—10 l, bine etanșeizate. În acest din urmă caz, fiolele cu material trebuie închise la flacără. Un dezavantaj al metodelor bazate pe congelare este însă că, în special în cazul lichidelor embrionare, se diminuează substanțial titrul hemaglutinant. Pentru acest motiv antigenele folosite în reacții de hemaglutinare nu se păstrează în acest fel.

Conservarea prin glicerină la + 4°C este una din cele mai comode metode, mai ales în cazul fragmentelor de organe virulente. Prin acest procedeu majoritatea virusurilor își mențin nealterate însușirile (antigenitatea, patogenitatea) luni sau chiar ani de zile. Trebuie subliniat că rickettsiile nu rezistă în aceste condiții decît cîteva zile.

Pentru conservare se introduc fragmente mici de țesuturi (2—4 cm) în recipiente conținînd glicerină sterilă și neutră, în cantități suficiente pentru a împiedica contactul țesutului cu aerul. Prepararea glicerinei neutre (tamponate) se face astfel (metoda Lépine):

- Soluția A
 - difosfat de sodiu p.a. 179,12 g
 - apă distilată 500 ml

Soluția poate cristaliza la temperatura camerei, de aceea pentru redizolvare se reîncălzește ușor înainte de întrebuințare.

- Soluția B
 - monofosfat de potasiu p.a. 68,08 g
 - apă distilată 500 ml

În momentul preparării glicerinei tamponate se determină întîi pH-ul glicerinei, diluînd o cantitate de glicerină cu aceeași cantitate de apă distilată neutră și folosind una din metodele curențe.

Pentru glicerina slab acidă (pH peste 5,5) se va folosi:

- soluția A 3,5 ml
- soluția B 1,5 ml
- apă distilată 95 ml
- glicerină 100 ml

Pentru glicerina puternic acidă (pH sub 5,5) se va folosi:

- soluție A 8 ml
- soluție B 2 ml

- apă distilată 90 ml
- glicerină 100 ml

Glicerina astfel preparată va fi repartizată în recipiente de 20—50 ml închise cu dopuri de vată și tifon și se va steriliza la autoclav.

Preparată în acest fel, glicerina poate fi folosită vreme îndelungată. Deoarece atât glicerina cât și fosfații au o acțiune nocivă asupra diferitelor țesuturi și în special asupra sistemului nervos central, înainte de folosire pentru inocularea la animale a unor asemenea materiale, ele vor trebui să fie bine spălate în soluție fiziologică sterilă.

Conservarea prin liofilizare se face după procedeul expus. Trebuie specificat însă că unele virusuri necesită condiții speciale de liofilizare, pentru a-și păstra proprietățile. De asemenea, este util să se sublinieze că în cursul manevrărilor legate de liofilizare este necesar să se respecte cu rigurozitate condițiile de sterilitate, atât pentru a împiedica contaminarea produsului respectiv cu germeni bacterieni sau muceți, cât și pentru a preîntâmpina contaminarea mediului cu virus.

Datorită faptului că prin procesul de sublimare a apei, din cursul liofilizării, în pulberea virulentă rămân și sărurile care au intrat în structura lichidului în care s-a realizat suspensia, resuspendarea produsului liofilizat se face întotdeauna în apă distilată, într-o cantitate echivalentă celei inițiale.

Conservarea serurilor imune

Se poate face prin mijloace fizice și chimice.

— Conservarea prin mijloace fizice presupune păstrarea la temperaturi scăzute ($+4^{\circ}\text{C}$ sau congelare și liofilizare). Prin păstrarea la $+4^{\circ}\text{C}$ se poate realiza o durabilitate de câțiva ani. Congelarea se face la -20°C — -60°C . Liofilizarea este una din metodele care în ultimii ani a luat o extindere din ce în ce mai mare în laboratoarele de specialitate.

— Conservarea prin mijloace chimice constă în adăugarea unor substanțe antiseptice cum ar fi fenolul (0,3—0,5%), chinolul (0,05%), mertiolatul de sodiu (1/10 000—1/20 000) etc. Aceștia nu au efect distructiv asupra anticorpilor din ser.

Conservarea alexinei

Ca și în cazul serurilor, se poate realiza fie prin mijloace fizice, fie cu ajutorul substanțelor chimice.

— Mijloacele fizice constau în păstrarea la $+4^{\circ}\text{C}$, congelare și liofilizare.

— Mijloacele chimice presupun folosirea unor substanțe cu rol conservant. Astfel pot fi amintite:

— fenolul cristalizat 0,4 g \pm 1,0 g NaCl chimic pur, la 10 ml ser proaspăt de cobai (conținând alexină). Se agită zilnic pînă cînd substanțele se dizolvă; se conservă la frigider la $+4^{\circ}\text{C}$;

- o soluție de 3,0 g acid boric + 17,0 g NaCl + 100 ml apă adăugată serului de cobai în proporție de 1/10;
- o soluție de sulfat de sodiu 10‰ și acid boric 4‰, amestecate în părți egale cu serul de cobai;
- o soluție preparată din 12,0 g acetat de sodiu și 4,0 g acid boric la 100 ml; se folosește în părți egale cu serul de cobai de conservat.

Conservarea frotiurilor

Diferite considerente impun conservarea frotiurilor în timp. Aceasta se poate face în stare colorată sau necolorată. În acest din urmă caz, este necesară însă fixarea prin unul din mijloacele adecvate, în funcție de natura frotiurilor.

Indiferent de starea în care urmează a fi conservate, este necesar să se aleagă locuri uscate, ferite de praf și de lumină, mai ales de razele solare. Este preferabil să se pună în cutii speciale, cu rastel, în care să existe și posibilitatea de identificare rapidă (notare exterioară).

Dacă se dorește păstrarea unui frotiu care a fost examinat la imersie, se șterge oleul de cedru, cu ajutorul unui tampon cu vată, tifon sau hîrtie de filtru îmbibate cu xilol, după care se usucă și se pune la păstrare. Montarea în balsam de Canada, deși realizează o bună protecție mecanică, accelerează decolorarea frotiurilor și în acest caz nu este posibilă o recolorare (în cazul frotiurilor decolorate, nemontate, acest lucru este ușor de realizat).

Prepararea unor soluții, coloranți și reactivi de laborator de uz curent

1 – Coloranți și soluții folosite în colorări

Soluțiile colorante de bază sînt în general soluții alcoolice saturate și se prepară astfel:

- alcool 96° 100,0 ml
- colorant 10,0 – 15,0 g

Se mojarază colorantul cu o parte de alcool și apoi se adaugă treptat restul alcoolului, căutînd să se realizeze o omogenizare cît mai temeinică a colorantului de pe pereții mojarului. Amestecul se ține cîteva zile la termostat pentru maturare, în flacoane închise etanș, agitînd din cînd în cînd. Apoi se păstrează la temperatura camerei, la adăpost de lumină. Din această soluție de bază se prepară soluțiile apoase.

Soluția de fucsină fenicată concentrată (Ziehl)

- soluție de bază de fucsină, filtrată 10,0 ml
- fenol (acid carbolic lichefiat) 5,0 ml
- apă distilată 100,0 ml

Soluția de fucsină fenicată diluată

- soluție de fucsină fenicată concentrată 10,0 ml
- apă distilată 90,0 ml

Soluția de violet de Gențiană

- violet de Gențiană, soluție de bază 10,0 ml
- fenol (acid carbolic lichefiat) 1,0 ml
- apă distilată 100,0 ml

Soluția Lugol

- iodură de potasiu 2,0 g
- iod metalic 1,0 g
- apă distilată pînă la 300,0 ml

Se dizolvă mai întîi iodura de potasiu într-o parte de apă distilată, se adaugă iodul, iar apoi se completează cu apa distilată pînă la 300 ml. Soluția se păstrează la adăpost de lumină, deoarece sub acțiunea acesteia se formează acid iodic, care-i conferă o reacție acidă. Dacă în timp pH-ul se modifică spre aciditate, se neutralizează cu bicarbonat de sodiu.

Soluția de albastru de metilen alcalin (Löffler)

- albastru de metilen, soluție de bază 30,0 ml
- hidroxid de potasiu, soluție 1% 1,0 ml
- apă distilată 100,0 ml

Soluția de albastru de metilen diluată

- soluție de albastru de metilen Löffler 10,0 ml
- apă distilată 90,0 ml

Amestecul decolorant alcool-acetonă (pentru colorația Gram)

- alcool 96° 3 părți
- acetonă 1 parte

Amestec decolorant pentru acido-alcalo-rezistenți (alcool-acid)

- alcool 70° 97,0 ml
- acid clorhidric concentrat 3,0 ml

Soluția colorantă May-Grünwald

- eozinat de albastru de metilen 1,0 g
- glicerină neutră p.a. 50,0 ml
- alcool metilic p.a. 100,0 ml

Soluția colorantă Giemsa

- eozinat de azur de metilen 3,0 g
- azur de metilen 0,3 g
- glicerină neutră p.a. 250,0 ml
- alcool metilic 200,0 ml

Se încălzește glicerina la 60°C, se adaugă pe rând cele două substanțe colorante, perfect uscate și pulverizate. Se agită pînă la dizolvare, se încălzește din nou la 60°, se adaugă alcoolul metilic. Se agită și se filtrează după 24 de ore. Păstrarea se face în sticle colorate, etanș închise.

Soluția de hematoxilină (Mayer)

- hematoxilina 1,0 g
- iodat de potasiu 1,0 g
- alaun de potasiu 50,0 g
- apă distilată pînă la 1 000,0 ml

Se dizolvă mai întîi alaunul în apă, apoi se adaugă hematoxilina. După dizolvarea acesteia se adaugă iodatul de sodiu, care produce oxidarea rapidă a hematoxilinei. Soluția se lasă să se matureze timp de 3—4 zile, după care se filtrează.

Soluția de hematoxilină ferică (Heidenheim)

Soluția A:

- hematoxilină 1,0 g
- alcool 96° 100,0 g

Soluția B:

- perclorură de fier 4,0 ml
- acid clorhidric 25% 1,0 ml
- apă distilată 95,0 ml

Se amestecă în părți egale soluțiile A și B, înainte de întrebuințare.

Soluția de eozină (sol. apoasă 1%)

- eozină 1,0 g
- apă distilată ad 100,0 ml

Soluția de eozină-eritrozină

- eozină 0,1 g
- eritrozină 0,1 g
- apă distilată 100,0 ml
- acid acetic glacial 1 picătură
- timol 1 cristal

Soluția de eritrozina-oranj G

— eritrozina	0,5 g
— oranj G	0,25 g
— apă distilată ad	100,0 ml

Soluția de verde luminos

— verde luminos cristalizat	0,5 g
— apă distilată	100,0 ml

Soluția de acid fosfomolibdenic

— acid fosfomolibdenic	1,0 g
— apă distilată	100,0 ml

Soluția de picrofucsina

— soluție apoasă de acid picric	100,0 ml
— fucsina acidă sol. 1%	5—10 ml

Soluția resorcin-fucsina

— fucsina bazică	2,0 g
— apă distilată	200,0 ml

Se adaugă 4,0 g resorcină și se fierbe într-o capsulă de porțelan, amestecându-se continuu. Se adaugă 25,0 ml perclorură de fier și se fierbe în continuare 2—5 minute. După răcire se filtrează. Filtratul se aruncă, iar filtrul cu precipitatul se aduc din nou în capsula de porțelan și se adaugă 200 ml alcool de 95°. Se amestecă continuu pînă la dizolvare completă. Se filtrează și se completează pînă la 200 ml cu alcool 95°. Se adaugă 4 ml acid clorhidric 25% (oficinal).

Soluția de Sudan III

— Sudan	0,1 g
— alcool 40°	100,0 ml

Amestecul se fierbe și se agită continuu, pînă la completa dizolvare, apoi se răcește și se filtrează.

Soluția de albastru de toluidină fenicată

— albastru de toluidină	5,0 g
— alcool absolut	100,0 ml
— apă distilată	500,0 ml
— soluție de fenol 5%	500,0 ml

Soluția de lactofenol — Wasserblau

— fenol cristalizat	20,0 g
— acid lactic	20,0 g
— glicerină	40,0 g
— Wasserblau	0,1 g
— apă distilată	20,0 g

Soluția de verde de metil-pyronină

— verde de metil cristalizat	0,15 g
— pyronină	0,25 g
— alcool 96°	2,5 ml
— glicerină	20,0 ml
— fenol 0,5% ad	100,0 ml

2 — Soluții tamponate*Soluția fiziologică de clorură de sodiu*

— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	3,22 g (0,009 m)
— KH_2PO_4	0,82 g (0,006 m)

- NaCl 7,89 g (0,135 m)
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția tampon veronal-acetat ($pH_A = 7,35$)

Soluția veronal-acetat :

- acetat de sodiu (3 H₂O) N/7 9,714 g
- veronal sodic M/7 14,714 g
- apă distilată 500,0 ml

Din această soluție se prepară tamponul astfel :

- soluție veronal-acetat 250,0 ml
- NaCl 4,25% 200,0 ml
- HCl N/10 217,0 ml
- apă distilată 683,0 ml

Soluția Eagle de bază

- NaCl 170,0 g
- KH₂PO₄ 2,7 g
- Na₂HPO₄ · 2H₂O 11,3 g
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Din aceasta se prepară soluția de lucru astfel :

- soluție Eagle de bază 50,0 ml
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția tampon-fosfat M/15 de bază

Soluția A :

- KH₂PO₄ 9,078 g
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția B :

- Na₂HPO₄ · 2 H₂O 11,876 g
- apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluțiile de lucru se prepară prin amestecarea soluției de bază A și B în proporții variabile în funcție de pH-ul dorit.

Tabelul 11

Prepararea soluției tampon-fosfat cu pH-ul dorit

Soluția A	Soluția B	pH-ul la 20°C
100 ml	12,1	6,0
"	18,4	6,2
"	26,4	6,4
"	37,2	6,6
"	49,2	6,8
"	61,2	7,0
"	72,6	7,2
"	81,8	7,4
"	88,5	7,6
"	93,6	7,8
"	96,9	8,0

Soluția de apă tamponată pentru hematologie

- fosfat monopotasie ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 0,49 g
- fosfat bisodic (PO_4HNa_2) 1,14 g
- apă distilată 200,0 ml

Soluția are un pH de 7,2. Înainte de folosire se diluează 1/10 (o parte soluție tampon și 9 părți de apă distilată).

3 – Soluții izotonice*Soluția Alsever*

- Citrat de sodiu $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 8,0 g
- NaCl 4,2 g
- Glucoză 20,5 g
- Acid citric soluție 10% 8,0 ml
(acid citric $\cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Locke

- NaCl 9,0 g
- CaCl_2 0,2 g
- Na_2HCO_3 0,2 g
- KCl 0,5 g
- Glucoză 2,0 g
- Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Ringer

- NaCl 9,0 g
- CaCl_2 0,2 g
- KCl 0,2 g
- Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Tyrode

- NaCl 8,0 g
- CaCl_2 0,2 g
- KCl 0,2 g
- MgCl_2 0,1 g
- NaH_2PO_4 0,05 g
- Na_2HCO_3 1,0 g
- glucoză 1,0 g
- apă distilată ad 1 000,0 ml

4 – Soluții indicatoare

Principalele caracteristici, ca și modul de preparare a soluțiilor indicatoare cele mai frecvent folosite sînt redată în tabelul 12.

Soluții indicatoare mai frecvent folosite

Indicatorul	Preparare				Cantități necesare la 10 ml sol cercetat	Culoarea		
	Indica- tor g	NaOH u/100 ml	Alcool 96°/ml	Apă dist. ml ad		Mediu acid	Limite de viraj	Mediu alcalin
Albastru de timol	0,1	—	—	250	5	Roșu	1,2—2,8	Galben
Benzyl oranž	0,1	—	—	1 000	3—6	Roșu	1,9—3,3	Galben
Metil oranž	0,1	—	—	1 000	3—5	Roșu	3,1—4,4	Galben oranž
Albastru de brom fenol	0,1	14,9	—	250	5	Galben	3,0—4,6	Violet
Verde brom crezol	0,1	14,3	—	250	5	Galben	3,8—5,4	Albastru
Roșu metil	0,1	—	300	500	2,4	Roșu	4,2—6,3	Galben
Brom crezol purpur	0,1	18,5	—	250	5	Galben	5,2—6,8	Purpur
Albastru de brom timol	0,1	16,0	—	250	5	Galben	6,0—7,6	Albastru
Roșu neutru	0,02	—	100	200	10—20	Roșu	6,8—8,0	Galben
Roșu fenol	0,1	28,2	—	250	5	Galben	6,4—8,2	Roșu
Roșu crezol	0,1	26,2	—	250	5	Galben	7,8—8,8	Roșu
Albastru de timol	0,1	21,5	—	250	5	Galben	8,0—9,6	Albastru
Fenolftaleină	0,1	—	100	200	230	Incolor	8,3—10,0	Roșu
Timolftaleină	0,1	—	125	210	310	Incolor	9,3—10,5	Albastru
Galben alizarină	0,025	—	—	250	510	Galben	10,1—12,1	Roșu

Amestec indicator pentru pH 7,0

— soluție roșu neutru 0,1% în alcool

— 1 parte

— albastru de metilen 0,1% în apă

— 1 parte

Indicatorul este albastru-violet la pH 7,0 și devine verde la pH mai ridicat.

5 – Alți reactivi de laborator*Reactivi pentru punerea în evidență a indolului*

Se prepară conform tabelului 13.

Tabelul 13

Prepararea reactivilor pentru punerea în evidență a indolului

Componenta	Reactivul Ehrlich Böhme	Modificat Pringsheim	Modificat Kovacs	Reactivul Kovacs Hoffman	Soluție pentru impregnarea hîrtiei reactive (Gillies)
Para-dimetilamino bezaldehidă	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0
Alcool metilic	—	10,0	—	—	50,0
Alcool etilic 95%	95,0	—	—	—	—
Alcool amilic chimic pur	—	—	75,0	—	plus 10,0 acid fosforic
Alcool butilic	—	—	—	75,0	
Acid clorhidric	20,0	8,0	25,0	25,0	
Cantitatea de reactiv necesară pentru 5 ml cultură în apă peptonată	3 picături	3 picături	3 picături	1 ml	

Reactivul Griess-Ilosvay

Reactivul 1:

- alfa-naftolamină 1,0 g
- apă distilată 22,0 ml

Amestecul se încălzește, se filtrează și se adaugă 1 ml acid acetic diluat în proporție de 4 ml acid acetic glacial în 7 ml apă.

Reactivul 2:

- acid sulfanilic 0,5 g
- acid acetic diluat 150,0 ml

Reactivul Schiff. Se dizolvă 1,5 g fucsina acidă în 300 ml apă distilată fierbinte. Se filtrează prin hîrtie Whatmann la 55°C. Soluției răcite la 40°C i se adaugă 25 ml HCl 2N și 375 g metabisulfid de sodiu. Se agită pentru o dizolvare rapidă. Se completează la 500 ml cu apă distilată. Se pune pentru 16 ore la frigider, în flacon brun, după care se adaugă 2,5 g cărbune activ Merck și se lasă în contact timp de 10 minute. Se filtrează rapid (2—3 minute) prin hîrtie Whatmann sau altă hîrtie de filtru de calitate. Soluția trebuie să fie incoloră sau cu o ușoară nuanță galbenă. Dacă culoarea este roșie, este inutilizabilă. Înainte de utilizare, se lasă să se încălzească la temperatura camerei.

Apa de Javelle. Se dizolvă 50 g CaOCl₂ în 600 ml apă distilată fierbinte. Se agită și se adaugă 270 ml dintr-o soluție 20% KCO₃, se fierbe pentru a îndepărta eventualul amoniac (la 90°C pentru scurt timp). Se răcește și se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se încearcă chimic dacă există ioni de calciu liber; dacă sînt, se încălzește soluția și se mai adaugă clorură de calciu. Se filtrează și se păstrează în sticle brune.

— *Soluția Berthelot*

— $\text{SO}_4\text{Mn } 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,0 g
— $\text{SO}_4\text{Ca } 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g
— $\text{Cl}_2\text{Ni}_6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
— $\text{Cl}_2\text{CO}_6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
— $(\text{SO}_4)_2\text{Ti}_2$	0,20 g
— $\text{SO}_4 \text{ 2n } 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,10 g
— $\text{SO}_4\text{Cu } 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,05 g
— $\text{SO}_4\text{K}_2 \text{ 4 H}_2\text{O}$	0,10 g
— H_2BO_3	0,05 g
— H_2SO_4	1,0 ml
— $(\text{SO}_4)_3 \text{ Fe}_2$	50,0 g
— Apă distilată	1 000,0 ml

6 – Diverse

Prepararea extractului de drojdie. Se suspensionează 50 g drojdie proaspătă în 100 ml soluție de monofosfat de potasiu (KH_2PO_4) 0,2 M, se încălzește la 80—85°C, timp de 20 minute, se filtrează prin Seitz. Se conservă în stare congelată.

Se poate prepara și din drojdie uscată. La 1 l apă distilată se adaugă 25 g drojdie uscată, se încălzește la fierbere, se filtrează prin două straturi de hîrtie de filtru și se ajustează pH-ul la 8,0, cu o soluție de NaOH, după care se centrifughează la 2000—3000 T/m, timp de o oră. Supernatantul se sterilizează prin filtrare prin Seitz și se conservă la —20°C.

Prepararea rondelilor îmbibate cu nitrofuran, pentru antibiogramă. Se prepară inițial o soluție de nitrofuran, prin dizolvarea a 100 mg Nitrofuran în 200 ml acetonă. Se îmbibă apoi hîrtie de filtru obișnuită cu soluția de Nitrofuran și se usucă (eventual la raze infraroșii). După uscare se îmbibă din nou și iarăși se usucă. Apoi se taie rondelile cu ajutorul unui perforator de hîrtie. Cantitatea de substanță activă dintr-o rondelă este de cca 8—10 micrograme.

În aceeași manieră se poate recurge la pregătirea de rondelile conținînd orice alte chimioterapice sau antibiotice, cu condiția de a le vehicula în solvenți corespunzători și de a asigura concentrația minimă necesară.

Inactivarea serurilor destinate pentru RFC, în vederea distrugerii alexinei proprii. Se face la temperaturi și pe perioade variabile, în funcție de specie:

— Bovine	56°C — 30 minute
— Cabaline	60°C — 20 minute
— Porcine	62°C — 50 minute
— Cîine	65°C — 20 minute
— Iepure	65°C — 20 minute
— Cobai	56°C — 20 minute
— Om	56°C — 20 minute

Prepararea unor soluții stock de antibiotice. Penicilină-streptomicină. La un flacon de 1 000 000 U.I. penicilină G potasică se adaugă 5 ml apă distilată sterilă. La un flacon de 1 g streptomicină sulfat se adaugă 5 ml

apă distilată sterilă. Soluția de streptomycină se transvazează apoi în flaconul cu penicilină, rezultând concentrația de 100 000 U.I. penicilină și 100 000 micrograme streptomycină/ml. La fiecare litru de mediu se adaugă 1 ml soluție de penicilină + streptomycină, rezultând o concentrație finală de 100 U.I./ml penicilină și 100 micrograme/ml streptomycină. Dacă soluția urmează să fie utilizată în următoarele 4 zile, ea poate fi păstrată la $+4^{\circ}\text{C}$, altfel la -20°C . Soluția nu este însă bine să fie congelată și decongelată repetat.

Polimixina B — sulfat. La un flacon de 1 000 000 U. Polimixina se adaugă 10 ml apă distilată sterilă, rezultând o concentrație de 100 000 U./ml. Se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$ dacă se folosește în decurs de o săptămână, altfel la -20°C . Din această soluție se adaugă la 1 litru de mediu, 0,5 ml, rezultând o concentrație de 50 unități/ml.

Stamicina. La un flacon de 500 000 U. se adaugă 10 ml apă distilată sterilă, rezultând o concentrație de 50 000 U./ml. Se păstrează identic cu Polimixina. La 1 litru mediu se adaugă 1 ml soluție, obținându-se o concentrație finală de 50 U./ml.

Prepararea scării Brown. Scara Brown este constituită dintr-o serie de tuburi conținând suspensii de turbidități diferite, care prin comparație permit stabilirea aproximativă a concentrației în germeni a unor suspensii bacteriene.

Se aleg 10 tuburi de sticlă neutră cu același diametru (7—10 mm diametru).

— Se prepară o soluție 1% BaCl_2 și se pune în fiecare tub câte o cantitate crescândă, de la 0,1 la 1,0 ml (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 1,0 ml).

— Se prepară o soluție de H_2SO_4 1% și se completează în fiecare tub pînă la 10 ml.

— Se astupă tuburile cu dopuri de cauciuc sau se închid la flacăra.

În tuburi se formează un precipitat alb de sulfat de bariu, care corespunde unei turbidități egale cu:

tubul 1 = 300 milioane germeni

tubul 2 = 600 milioane germeni

tubul 3 = 900 milioane germeni

tubul 10 = 300 miliarde de germeni

Prepararea scării McFarland servește aceluiași scop ca și precedenta și se prepară din H_2SO_4 1/10 și BaCl_2 1/20.

Pentru prepararea H_2SO_4 1/10 n se pun 9,8 g H_2SO_4 , cu greutate specifică 1,84 în 1000 ml apă. BaCl_2 1/20 n se prepară punind 12,22 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ în 1000 ml apă distilată.

Tabelul 14

Prepararea soluțiilor necesare scării McFarland

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H_2SO_4 1/10 ml	99	98	97	96	95	94	93	92	91	90
BaCl_2 1/20 ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Turbiditate corespunzătoare la Nr. bacterii/ml	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3 000

Trebuie specificat însă că soluția nu este stabilă la infinit, așa încât din timp în timp scara trebuie refăcută.

Lichidul conservant Iores se folosește pentru fixarea pieselor anatomice sau anatomopatologice fără a pierde colorația diferitelor elemente constitutive. Se compune din două soluții:

— Soluția A :

— cloral hidrat	50,0 g
— sulfat de sodiu	50,0 g
— formol	50,0 ml
— apă de robinet	1 000,0 ml

În această soluție piesele se țin 10—14 zile, după care se spală timp de 24—48 de ore la apă curentă.

— Soluția B :

— acetat de potasiu (sau sodiu)	400,0 g
— glicerină	500,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Este soluția în care piesele se pun definitiv, în borcane corespunzătoare mărimii lor. Cu toate că culorile se conservă destul de bine, piesele vor fi ferite de lumina solară directă.

Lichidul conservant Keiserling se folosește de asemenea pentru conservarea pieselor anatomice, cu un aspect cât mai apropiat de cel natural.

— Soluția A :

— azotat de potasiu (sau sodiu)	15,0 g
— acetat de potasiu	30,0 g
— formol	200,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

În această soluție, piesele se lasă 1—3 zile, după mărimea lor, după care se spală cu apă și se scufundă în alcool 90°, într-o cantitate de 3—4 ori mai mare decât volumul piesei. Se țin 1—3 zile și se trec apoi în:

— Soluția B (conservantă):

— acetat de potasiu	250,0 g
— alcool 90°	250,0 ml
— glicerină	1 000,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Dacă se dorește ca din piesele respective să se facă și secțiuni histopatologice lichidul conservant se înlocuiește cu un lichid având următoarea compoziție:

— alcool 95°	2 000,0 ml
— glicerină	800,0 ml
— acetat de potasiu	400,0 g
— apă distilată	400,0 ml

Albumina glicerinată (Mayer). Se amestecă în părți egale glicerina cu albuș de ou. În acest scop, membranele albuminoase se sectionează prealabil cu foarfeca, după care amestecul se filtrează printr-un fil gros, avându-se grija de a se adăuga un cristal de timol care să împied

1.
ă
ml

Trebuie specificat însă că soluția nu este stabilă la infinit, așa încât din timp în timp scara trebuie refăcută.

Lichidul conservant lores se folosește pentru fixarea pieselor anatomiche sau anatomopatologice fără a pierde colorația diferitelor elemente constitutive. Se compune din două soluții:

— Soluția A :

— cloral hidrat	50,0 g
— sulfat de sodiu	50,0 g
— formol	50,0 ml
— apă de robinet	1 000,0 ml

În această soluție piesele se țin 10—14 zile, după care se spală timp de 24—48 de ore la apă curentă.

— Soluția B :

— acetat de potasiu (sau sodiu)	400,0 g
— glicerină	500,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Este soluția în care piesele se pun definitiv, în borcane corespunzătoare mărimii lor. Cu toate că culorile se conservă destul de bine, piesele vor fi ferite de lumina solară directă.

Lichidul conservant Keiserling se folosește de asemenea pentru conservarea pieselor anatomice, cu un aspect cât mai apropiat de cel natural.

— Soluția A :

— azotat de potasiu (sau sodiu)	15,0 g
— acetat de potasiu	30,0 g
— formol	200,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

În această soluție, piesele se lasă 1—3 zile, după mărimea lor, după care se spală cu apă și se scufundă în alcool 90°, într-o cantitate de 3—4 ori mai mare decât volumul piesei. Se țin 1—3 zile și se trec apoi în:

— Soluția B (conservantă):

— acetat de potasiu	250,0 g
— alcool 90°	250,0 ml
— glicerină	1 000,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Dacă se dorește ca din piesele respective să se facă și secțiuni histopatologice lichidul conservant se înlocuiește cu un lichid având următoarea compoziție:

— alcool 95°	2 000,0 ml
— glicerină	800,0 ml
— acetat de potasiu	400,0 g
— apă distilată	400,0 ml

Albumina glicerinată (Mayer). Se amestecă în părți egale glicerina cu albuș de ou. În acest scop, membranele albuminoase se secționează prealabil cu foarfeca, după care amestecul se filtrează printr-un fil gros, avându-se grija de a se adăuga un cristal de timol care să împied

ă.
ă
nl

Creioane de scris pe sticlă. Pentru cca 40 de creioane sînt necesare următoarele:

- | | |
|--|---------|
| — ceară de albine, cit mai pură | 100,0 g |
| — seu de bovine (nu ovine) crud și topit
ex tempore | 100,0 g |
| — oxid de zinc chimic pur | 500,0 g |

Ceara și seuul se topesc bine, într-un vas la baia de apă și se omogenizează cit mai temeinic. Se adaugă cite puțin oxidul de zinc, în timp ce se amestecă cu o lingură farmaceutică metalică, pînă la epuizarea întregii cantități. Se continuă amestecarea pînă se obține o pastă omogenă (10—15 minute). În această fază fie că se întinde pe o suprafață plană sub formă de luminări cu un diametru de 6—8 mm, fie că se toarnă în forme (tuburi de sticlă) care apoi se înlătură prin spargere. Solidificarea totală se realizează în cca 2 săptămîni. Creioanele ajustate la lungimea dorită se pot folosi învelite în hîrtie, fixate în tuburi de sticlă sau dispozitive speciale.

Cerneală de scris pe sticlă.

- | | |
|-------------------------------------|----------|
| — fucsina bazică (sau alt colorant) | 20,0 g |
| — alcool etilic 96° | 200,0 ml |

Amestecul se realizează prin mojarare, după care se pune 24 de ore la termostat. În ziua în care se scoate de la termostat se fierb 200 ml apă distilată cu 20 g tanin (acid) pînă scade la cca 1 ml. Se răcește și se adaugă amestecul de alcool + colorant. Se ține 24 de ore la temperatura camerei, se filtrează. Păstrarea se face de preferință la frigider.

Anexe

Anexa 1

Mijloace de diagnostic de laborator în principalele entități morbide la animale

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
A. Boli infecțioase bacteriene		
Antrax	<ul style="list-style-type: none"> — de la animale în viață: — frotiuri nefixate din sînge sau lichid de edem — de la cadavre: — frotiuri din sînge și edeme — porțiuni din ureche — os lung nedeschis — porțiuni din splină — porțiuni de tumoare — la porci și ganglioni retrofaringieni 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic (Giemsa, Gram) — bacteriologic — serologic — inoculări experimentale — test fagic
Pasteureloza	<ul style="list-style-type: none"> — cadavre întregi (animale mici și mijlocii) — os lung nedeschis — porțiuni de organe cu leziuni (pulmon, ganglioni, edeme) — frotiuri din organe și sînge 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic (Gram) — bacteriologic — inoculări experimentale (șoareci, porumbel)
Tularemia	<ul style="list-style-type: none"> — cadavre întregi — porțiuni de organe inclusiv ganglioni regionali — porțiuni de organe în glicerină 30% — sînge 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — serologic (SAL) — inoculări experimentale (șoareci, cobai)
Pseudotuberculoza	<ul style="list-style-type: none"> — cadavre întregi — organe cu leziuni suspecte inclusiv ganglioni — sînge — porțiuni de organe în formol 10% 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — serologic (SAL) — histopatologic
Salmoneloza mamiferelor	<ul style="list-style-type: none"> — organe cu leziuni (ficat, vezica biliară, rinichi, splină, ganglioni mezenterici, pulmon) — os lung nedeschis — cadavre întregi (animale mici) — avortoni, învelitori fetale în caz de avort — probe de sînge recoltate la 8—10 zile după avort 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — inoculări experimentale (rareori) — serologic (SAL)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Salmoneloza la păsări	<ul style="list-style-type: none"> — păsări adulte sau pui vii cu semne clinice caracteristice — cadavre proaspete — ouă incubate cu embrioni morți — organe suspecte 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — serologic (RHAR, SAR, SAL) — inoculări experimentale
Colibaciloza	<ul style="list-style-type: none"> — animale tinere în stare preagonică sau — anse intestinale legate — os lung — organe cu leziuni 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — serotipizarea — inoculări experimentale (testul ansei ligaturate pentru patogenitate)
Boala edemelor și enterotoxiemia colibacilară	<ul style="list-style-type: none"> — intestine (colon helicoidal) cu ganglioni mezenterici 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — serologic
Tuberculoza	<ul style="list-style-type: none"> — ganglioni și organe lezionate — porțiuni de organe lezionate în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic (Ziehl-Neelsen) — inoculări (cobai) — histopatologic
Paratuberculoza	<ul style="list-style-type: none"> — raclate de mucoasă rectală — fecale — sînge — de la cadavre: porțiuni de intestin gros 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic (Ziehl-Neelsen) — bacteriologic — serologic (RFC)
Bruceleza	<ul style="list-style-type: none"> — avortoni — învelitori fetale — secreții genitale — organe cu leziuni — sînge — lapte suspect — spermă 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic (Köster) — bacteriologic — serologic (RHAR, SAL, RFC lactoaglutinarea) — inoculări experimentale
Vibrioza	<ul style="list-style-type: none"> — tampoane cu secreții genitale — avortoni — învelitori fetale, cadavre miei 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic cecum (Gram) — bacteriologic
Leptospiroza	<ul style="list-style-type: none"> — sînge — urină în faza de leptospirurie, avortoni, învelitori — organe cu leziuni în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic direct, Tribondeau-Fontana — inoculări — histopatologic
Listerioza	<ul style="list-style-type: none"> — cadavre de animale mici — cap sau creier de la animalele cu tulburări nervoase la ovine — organe cu leziuni la alte specii 	<ul style="list-style-type: none"> — bacteriologic — inoculări
Botulism	<ul style="list-style-type: none"> — probe de furaje suspecte 	<ul style="list-style-type: none"> — inoculări
Necrobaciloză	<ul style="list-style-type: none"> — organe interne lezionate — secreții purulente 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic — bacteriologic
Actinomicoza Actinobaciloza	<ul style="list-style-type: none"> — secreții purulente — organe lezionate 	<ul style="list-style-type: none"> — bacterioscopic — bacteriologic

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Dizenteria anaerobă a micilor Enterotoxiemia oilor	— cadavre întregi — anse de intestin legate	— bacterioscopic — bacteriologic — proba toxicității conținutului intestinal și a neutralizării
Bronhopneumonia	— pulmon cu leziuni recente, ganglioni mediastinali — porțiuni de pulmon în fixator	— bacteriologic — virusologic — histopatologic
Piobaciloza porcului	— secreții purulente recoltate din abcese nedeschise	— bacteriologic
Linfadenita cazeoasă a oii	— secreții din abcese nedeschise	— bacterioscopic — bacteriologic
Streptococia porcilor	— organe cu leziuni — secreții articulare	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Piemia streptococică a minjilor	— organe lezionate — lichide articulare, conținutul abceselor nedeschise	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Streptococia păsărilor	— organe lezionate	— bacteriologic
Micoplasmoza aviară	— cadavre	— bacteriologic — serologic — histopatologic
Cărbunele emfizematos	— porțiuni de tumoare emfizematoasă, os lung, fragmente de organe	— bacterioscopic — bacteriologic — inoculări
Mamitele infecțioase	— secreție lactată	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic, micologic
Gurma	— secreții purulente din abcese nedeschise	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Morva	— conținut din chiști morvoși — secreții — sânge	— bacteriologic — inoculări — serologic (RFC)
Rujet	— organe interne (ficat, rinichi, os) — vegetații endocardice — articulații afectate	— bacterioscopic — bacteriologic — inoculări
B. Boli produse de rickettsii și chlamidii		
Febra Q	— placenta în caz de avort — secreții uterine — avorton — sânge	— microscopic (Stamp, Macchiavello etc.) — izolare pe ouă embrionate, inoculări — serologic
Conjunctivita rickettsiană a rumegătoarelor	— racle conjunctivale	— microscopic (Giemsa, Macchiavello, Stamp)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Avortul chlamidian	<ul style="list-style-type: none"> — avortoni — învelitori foetale — secreții genitale — sînge după 10 zile de la avort 	<ul style="list-style-type: none"> — microscopic (Stamp) — izolare pe ouă embrionate — inoculări — serologic (RFC)
C. Boli produse de virusuri		
Turbare	— creier (cap)	<ul style="list-style-type: none"> — microscopic (Lenz, Mann) din amprenta — histopatologic — inoculări
Boala lui Aujeszky	<ul style="list-style-type: none"> — animale mici — sistem nervos central la cele cu tulburări nervoase — porțiuni de pulmon, ficat, splină, rinichi la animale mari — avortoni în caz de avort 	<ul style="list-style-type: none"> — inoculări iepure — izolare pe culturi celulare
Variiolele mamiferelor	<ul style="list-style-type: none"> — cruste proaspete sau uscate — țesuturi lezionate în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare pe culturi celulare — histopatologic — inoculări
Difterovariola aviară	<ul style="list-style-type: none"> — țesuturi lezionate — țesuturi lezionate în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare pe culturi celulare — inoculări — histopatologic
Febra aftoasă	<ul style="list-style-type: none"> — lichid aftos — epitelii lezionate recoltate steril — epitelii în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare — inoculări — serologic — histopatologic
Stomatita veziculoasă	<ul style="list-style-type: none"> — țesuturi lezionate — lichid vezicular 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare — serologic (RFC)
Ectima contagioasă a oii	<ul style="list-style-type: none"> — cruste — țesuturi lezionate în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare — histopatologic
Leucoza bovină	<ul style="list-style-type: none"> — sînge — țesuturi lezionate în fixator 	<ul style="list-style-type: none"> — hematologic — serologic — histopatologic
Anemia infecțioasă a calului	<ul style="list-style-type: none"> — sînge — porțiuni de ficat recoltate prin biopsie — porțiuni de ficat, splină — un os lung 	<ul style="list-style-type: none"> — testul Coggins — hematologic — histologic — bioprobă
Boli respiratorii cabaline	<ul style="list-style-type: none"> — porțiuni de pulmon afectate — secreții ale căilor respiratorii — sînge 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare virusuri — serologic (RFC)
Pesta porcină	<ul style="list-style-type: none"> — cadavre — organe interne cu leziuni 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare virus — inoculări
Exantemul veziculos al porcului	<ul style="list-style-type: none"> — lichid vezicular, epitelii — sînge 	<ul style="list-style-type: none"> — izolare virus — serologic (RFC)

Anexa 1 (continuare)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Pseudopesta aviară	— cadavre — organe cu leziuni (creier)	— izolare virus — examen serologic — histopatologic
Laringotraheita infecțioasă	— mucoasă traheală în fixator	— histopatologic
Bronșita infecțioasă	— organe lezionate (pulmon, ovare) — sînge	— izolare virus — serologic (RHAR, SAL)
Encefalomielite aviară	— cadavre — creier	— histopatologic — izolare virus
Leucozele aviare	— sînge — cadavre — organe lezionate — organe lezionate în fixator	— hematologic — histopatologic
Hepatita virotică a bobocilor	— cadavre	— izolare virus
Mixomatoza iepurilor	— cadavre — mîxoame — porțiuni de țesuturi lezionate în fixator	— izolare virus — histopatologic

Anexa 2

Unele caractere ale celor mai importanți agenți bacterieni

Genul	Specia	Însușiri	Importanța etiologică
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa pyocyanea</i>	Gr. neg., mobil, aerob, bastonașe subțiri, nesporulat, pigmentogen, hemolitic	Afecțiuni ale aparatului digestiv, genital Germen de asociație în supurații
<i>Campylobacter</i> (<i>Vibrio</i>)	<i>foetus</i>	Gr. neg., mobil, anaerob bastonașe în formă de virgulă sau S	Avorturi, infecții genitale
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Gr. neg., în general, mobil, aerob, bastonașe polimorfe, capete rotunjite	Septicemii, tulburări digestive (enterotoxiemia), genitale, mamare
<i>Aerobacter</i>	<i>aerogenes cloacale</i>	Gr. neg., imobil respectiv mobil, aerob, bastonașe scurte	Germeni obișnuiți ai florei intestinale
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	Gr. neg., imobil, aerob, capsulat, bastonașe scurte	Infecții ale aparatului respirator, urogenital, septicemii, mamite
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i> (<i>B. prodigiosum</i>)	Gr. neg., mobil, aerob, pigmentogen (roșu)	Biofit, germen al plăgilor și de putrefacție

Genul	Specia	Înșușiri	Importanța etiologică
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i> <i>religiosi</i> , <i>morgani</i> , <i>mirabilis</i>	Gr. neg., mobil, aerob, bastonașe scurte	Enteropatii (biofit, germen de putrefacție)
<i>Salmonella</i>	diferite specii	Gr. neg., mobil, aerob, bastonașe variabile. Diferențiere prin seroaglutinare	Septicemii la tineret. Avorturi, enterite, toxiiinfecții alimentare
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> <i>flexneri</i> <i>sonnei</i>	Gr. neg., imobil, aerob, bastonașe scurte	Disenterie. Toxiinfecții alimentare
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i> <i>hemolytica</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>tularensis</i>	Gr. neg., imobil, aerob, colorat bipolar, cocobacilar	Septicemii (holera), infecții generalizate și localizate la mamifere, infecții secundare respiratorii Pseudotuberculoza, tularemia
<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i> <i>abortus</i> , <i>suis</i> <i>ovis</i>	Gr. neg., imobil, aerob (anaerob) cocobacili foarte fini	Avorturi, septicemii, spondilartrite, orhite
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i> <i>suis</i> <i>gallinarum</i>	Gr. neg., imobil, aerob, cocobacili fini	Germeni de asociație în bolile respiratorii
<i>Actinobacillus</i>	<i>lignieresii</i> <i>equuli mallei</i>	Gr. neg., imobil, aerob, coccoid, cocobacilar	Agentul actinobacilozei, paraliziei mînjilor, morvei
<i>Sphaerophorus</i>	<i>necrophorus</i>	Gr. neg., imobil, anaerob, bastonașe subțiri cu filamente	Biofit, produce procese necrobacilare podale, bucale și organice la diferite specii
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i> <i>roseus</i> , <i>flavus</i> <i>pyogenes</i> <i>epidermidis</i>	Gr. poz., imobil, aerob, pigmentogen, coci dispuși neregulat	Condiționat patogen, supurații
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> <i>citreus</i> <i>albus</i>	Gr. poz., imobil, aerob, pigmentogen, coci dispuși neregulat	Supurații, piemii, mastite, toxiiinfecții alimentare
<i>Diplococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	Gr. poz., imobil, aerob, sferoid sau lanceolat	Pneumonii, septicemii la viței
<i>Streptococcus</i>	<i>equi pyogenes</i> <i>agalactiae</i> și alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, sferoid în lanțuri	Supurații, septicemii, mamite, gurmă
<i>Corynebacterium</i>	<i>pseudotuberculosis</i> <i>pyogenes</i> și alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, coccoid sau virguliform	Pseudotuberculoză, supurații. Piobaciloza, mamite

Genul	Specia	Însușiri	Importanța etiologică
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Gr. poz., mobil, aerob, coccoid pînă la bastonașe fine	Listerioză
<i>Erysipelothrix</i>	<i>insidiosa (rhusiopathiae)</i>	Gr. poz. (labil), imobil, aerob, talie mijlocie bastonașe fine, drepte	Rujet, erizipeloidul omului
<i>Bacillus</i>	<i>anthracis</i>	Gr. poz., imobil, aerob, sporulat, capsulat bastonașe cu capetele retezate	Antrax
	<i>larvae</i>	Gr. poz., mobil, aerob, sporulat	Loca americană
	<i>cereus subtilis</i> și alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, sporulat	Saprofiți în sol
<i>Clostridium</i>	<i>septicum chauvoei novyi/gigas botulinum tetani perfringens</i> tipurile A, F și alte specii	Gr. poz., mobili anaerobi, sporulați, bastonașe de talie variabilă în general mari imobil	Cărbune paraemfizematos, Cărbune emfizematos, Bradsotul oii, Botulism, Tetanos Enterotoxiemie
<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis bovis, avium paratuberculosis</i>	Gr. poz., imobil, aerob, acidorezistent, bastonașe, polimorfe	Tuberculoza la om și diferite specii animale Paratuberculoză
<i>Nocardia</i>	<i>farcinica asteroides</i> și alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, acidorezistent, filamentos	Abcese în piele, pulmon, creier
<i>Actinomyces</i>	<i>bovis israeli</i>	Gr. poz., imobil, anaerob, miceliform	Actinomicoză
<i>Borrelia</i>	<i>anserina</i>	Colorație Giemsa sau Tribondeau-Fontana, mobil, anaerob, pînă la 20 microni cu 3—6 spirale	Spirochetoza păsărilor
<i>Treponema</i>	<i>cuniculi</i>	Colorație Giemsa, mobil, anaerob, pînă la 14 microni lungime, spiralat 14—17 spire	Spirochetoza iepurilor
<i>Leptospira</i>	<i>icterohaemorrhagiae canicola pomona</i> și alte serotipuri	Colorație Giemsa, mobil, aerob, spiralat cu capetele încircligate	Leptospiroza diferitelor specii animale
<i>Mycoplasma</i>	<i>gallisepticum gallinarum hyorhinitis mastitidis pneumoniae</i> și alte specii	Colorații speciale, coci pînă la pleiomorfi	Boli ale aparatului respirator, mamite, alte procese inflamatorii ale aparatului genital

Anexa 3

Diferențierea unor bacterii Gram pozitive aerobe

Genul	Spori	Mobilitate	Catalază	Oxidază	Glucoză
a) Coci					
<i>Streptococcus</i>	—	—	—	—	+
<i>Micrococcus</i>	—	—	+	—	+(V)
<i>Staphylococcus</i>	—	—	+	—	+
<i>Corynebacterium</i>	—	—	+(V)	—	+
b) bacili					
<i>Listeria</i>	—	+	+	—	+
<i>Erysipelothrix</i>	—	—	—	—	+
<i>Bacillus</i>	+ x	+(V)	+	+(V)	+(V)
<i>Lactobacillus</i>	—	—	—	—	+

Legenda : + = pozitiv
 — = negativ
 +(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
 + x = apar și tulpini asporogene

Anexa 4

Diferențierea stafilococilor de micrococi

Caracterul	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Catalază	+	+	+
Reducere nitrați	+	+(V)	V
Testul O F	F	F	O sau —
Hemoliza	+(V)	—(V)	—
Coagulază	+ și (V)	—	—
Lichefierea gelatinei	+	—	V
Manitol	+(V)	—(V)	V

Legenda : O = oxidare
 F = fermentare
 V = variabil
 +(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
 —(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție negativă

Anexa 5

Diferențierea principalelor categorii de streptococi

Categoria	Capacitatea de a se dezvolta pe :			
	Agar Mc Konkey	la 45°	Medii cu 6,5% NaCl	Lapte cu 0,1% albastru de metilen
<i>Piogenes</i>	—	—	—	—
<i>Viridans</i>	—	+	—	—
<i>Lactici</i>	—	—	—	+
<i>Enterococi</i>	+	+	+	+

Diferențierea genurilor de Enterobacteriaceae

Genul	Indol	R.M.	VP	Cit	H ₂ S	Urează	I _{act.}	Zah.	KCN	Gel.
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	V	-	-
<i>Shigella</i>	-(V)	+	-	-	-	-	-X	-X	-	-
<i>Salmonella</i>	-	+	-	V	+(V)	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	+	-	+	+(V)	(V)	V	V	+	-
<i>Klebsiella</i>	-(V)	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Proteus</i>	V	+	-(V)	V	V	+	-	V	+	V
<i>Providencia</i>	+	+	-	+	-	-	-	V	+	-

Legenda : X = excepție *Shigella sonnei*
 RM = mediul roșu metil
 VP = reacția Voges Proskauer
 Cit = mediul cu citrat

Identificarea principalelor genuri Gram negative

Genul	OF	M. Konkey	Oxidază	Catalază	Mobili- tate	Observații
<i>Enterobacteriaceae</i>	F F F	+	-	+	+(V) - -	Vezi anexa 6
<i>Yersinia</i>	F F	+	-	+	- +	<i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>Pseudomonas</i>	O O O	+	+	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i> <i>Ps. pseudomalei</i> <i>Ps. malei</i>
<i>Aeromonas</i>	F F	+	+	+(V)	+	<i>A. hydrophila</i> <i>A. shigelloides</i> <i>A. salmonicola</i>
<i>Pasteurella</i>	F F	-	+	+	- -	<i>P. multocida</i> <i>P. hemolytica</i>
<i>Actinobacillus</i>	F	-	+	+	-	
<i>Bordetella</i>	-	+	+	+	+	<i>B. bronchiseptica</i>
<i>Alkaligenes</i>	-	+	+	+	+	<i>A. faecalis</i>
<i>Brucella</i>	-	-	+	+	-	
<i>Neisseria</i>	O	-	+	+	-	

Legenda : F = fermentare
 O = oxidare
 + = reacție pozitivă
 - = reacție negativă
 +(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
 S = reacție slabă

Anexa 8

Diferențierea principalelor specii de germeni anaerobi Gram negativi

Caracterul	<i>Sph. necrophorus</i>	<i>Bacterioides</i>		
		<i>melaninogenes</i>	<i>fragilis</i>	<i>serpens</i>
Mobilitate	—	—	—	+
Indol	+	+	—	—
H ₂ S	V	+	—	—
Hemoliză	+	+	—	—
Catalază	V	—	V	—
Lichefiere gelatină	—	V	—	—
Glucoză (acidif.)	+	+	+	+
Lactoză	V	+	—	+
Maltoză	+	+	—	+
Zaharoză	+	+	+	+
Manitol	V	+	—	—

Anexa 9

Diferențierea *B. anthracis* de *B. cereus*

Caracterul	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>
Mobilitate	—	Obişnuit +
Capsulogeneză	+	—
Salicină (acidifiere)	încet sau —	rapid
Reducerea albastrului de metilen	încet	rapid
Hidroliza gelatinei	încet	rapid
Lapte turnesolat	coagulat și peptonizat încet	coagulat și peptonizat rapid
Hemoliză	— sau f. slabă	adesea puternic hemolitic
Penicilină	obişnuit sensibil	insensibil

Anexa 10

Diferențierea speciilor de *Brucella* și a biotipurilor lor (OMS)

Specia	Urează	Oxidază	Biotip	Necesar CO ₂	H ₂ S	Dezvoltare pe tionină			Coloranți Fucsină		Aglutinare ser sp. monovalent	
						A	B	C	B	C	A	M
<i>Brucella melitensis</i>	+	+	1	—	—	—	+	+	+	+	—	+
			2	—	—	—	+	+	+	+	+	—
			3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>Brucella abortus</i>	+	+	1	+(—)	+	—	—	—	+	+	+	—
			2	+	+	—	—	—	+	+	+	—
			3	—(+)	+	—	—	—	+	+	+	—
			4	+(—)	+	—	—	+	+	+	+	—
			5	—	—	—	+	+	+	+	—	+
			6	—	—	—	+	+	+	+	—	+
			7	—	—/+	—	+	+	+	+	+	+
			8	+	—	—	+	+	+	+	—	+
			9	—/+	+	—	+	+	+	+	—	+

Anexa 10 (continuare)

Specia	Urează	Oxidază	Biotip	Necesar CO ₂	H ₂ S	Dezvoltare pe tionină			Coloranți Fucsină		Aglutinare ser. sp. monovalent	
						A	B	C	B	C	A	M
<i>Brucella suis</i>	+	+	1	—	+	+	+	+	—	—	+	—
			2	—	—	—	+	+	—	—	+	—
			3	—	—	+	+	+	+	+	+	—
<i>Brucella ovis</i>	+	+		—/+	—			+		+		
<i>Brucella canis</i>	+	+		—	—			+		+		

Legenda : A = Concentrație 1/25 000
 B = „ 1/50 000
 C = „ 1/100 000

Anexa 11

Diferențierea speciilor de *Actinomyces*

Caracterul	<i>A. bovis</i>	<i>A. israeli</i>	<i>A. nasslundii</i>	Difteroizi anaerobi
Catalază	—	—	—	+
Hidroliză amidon	+	V	V	—
Reducere nitrat	—	+(V)	+(V)	+(V)
Lichefiere gelatină	—	—	—	(+)
Glucoză (acidif.)	+	+	+	+
Xiloză	—	+(V)	—	—
Rafinoză	—	V	+(V)	V

Anexa 12

Caracterele diferențiale ale unor specii mai importante din genul *Clostridium*

Specia	Mobilitate	Lichef. gelatinei	Nitrat	Indol	Prod. de acid					Urează	Alte caractere
					D	M	L	S	Z		
<i>Cl. perfringens</i>	—	+	+	—	+	+	+	V	+	—	
<i>Cl. septicum</i>	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	iepure sensibil
<i>Cl. fesceri</i>	+	+	+	—	+	+	+	(+)	+	—	iepure rezistent
<i>Cl. novi A</i>	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	
<i>Cl. novi B</i>	+	+	+	—	+	V	—	—	—	—	
<i>Cl. hemolyticum</i>	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	
<i>Cl. bifermentans</i>	+	+	—	+	+	+	—	+	—	—	
<i>Cl. botulinum neproteolitic</i>	+	+	—	—	+	V	—	V	V	—	
<i>Cl. botulinum proteolitic</i>	+	+	—	—	—	+	+	V	V	—	
<i>Cl. tetani</i>	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	
<i>Cl. sporogenes</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Cl. histolyticum</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	

Legenda : D = dextroză; M = maltoză; L = lactoză; S = salicină; Z = zaharoză

Virus	Proba preferată	Sistemul gazdă	Dovada infecției	Identificare
IBR	Tampoane nazale, oculare și vaginale; trahee, pulmon, rinichi, ficat fetal și rinichi fetal	Cultura celulară (de origine bovină)	ECP	NV AF
BVD	Tampoane nazale și fecale, splină, ggl. limf., intestin, leucocite, țesuturi fetale	Idem	ECP FA	NV AF
PI-3	Tampoane nazale, pulmon	Idem	ECP FA HA	NV FA IHA
Febra catarală malignă (MCF)	Tiroidă	Culturile se fac din celule din țesuturi suspecte	ECP	NV
ECBO	Tamp. nazale și fetale	Cult. celulare de orig. bovină	ECP	NV
Adeno bovin	Idem	Idem	ECP	NV
Pesta porcină	Amigdale, splină, ggl. limf.	Cult. celulare (linia PK-15)	AF	AF
Aujeszky	Creier, amigdale, pulmon, rinichi	Idem (inoc. iepuri s.c.)	ECP Prurit	NV AF
TGE porc	Intestin	Cult. primare renale porc	ECP AF	NV AF
ECPO și Teschen	Tamp. nazale, fecale, creier, intestin	Cult. cel. de orig. porcină	ECP	NV
Adeno porc	Tamp. fecale, nazale	Idem	ECP	NV
Encefalo-miocardită	Cord	Șoricel sugar i. cer.	Paralizia tren post. moarte	NV
Rino-pneumonie ecvină	Tamp. nazale, sînge	Renale ecvine	ECP	NV
Influență ecvină	Idem	Ou embrionat găină cavit. alantoidiană	moarte HA	IHA

Virus	Proba preferată	Sistemul gazdă	Dovada infecției	Identificare
Anemia infecțioasă ecvină	Diagnosticată curent prin test de difuz. în gel (Coggins)	—	—	—
Encefalomielite ecvină (EEE, EEW, VEE)	Creier	Cult. celul. (PK-15 și alte linii). Embrion de găină (diferite căi) șoarece sugar i. cer.	ECP Moarte Afect. creier și moarte	NV NV NV
Herpes canin	Pulmon, rinichi	Cult. cel. ren. câine	ECP	NV
Hepatită canină	Ficat, rinichi, pulmon	Idem	ECP	NV AF
Adeno canin	Pulmon	Idem	ECP	NV
Jigodie canină	Pulmon, vezică urinară, cerebel	Idem	AF	AF
Rinotraheită felină	Tamp. nazale, trahee, pulmon	Cult. cel. renale pisică	ECP	NV
Panleucopenie felină (gastroent.)	Intestin	Idem	AF	AF
Variola aviară	Leziuni	Embrion de pui (MCA)	Leziuni variolice	NV
Laringotraheită	Trahee, pulmon	Idem	Lez. focale	NV
Pseudo-pestă	Pulmon, cord, rinichi splină	Idem (cavit. alant.)	Moarte HA	IHA
Bronșită infect.	Trahee, pulmon	Idem	Piticire, închircire	NV
Encefalomielite aviară	Creier	Pui de o zi (i. cer.)	Tremurături, moarte	NV
Turbare	Creier	Șoareci sugari	Encefalită și moarte	AF NV

Legendă : ECP = efect citopatic ; NV = neutralizare virus ; AF = anticorp fluorescență ; HA = hemaglutinare ; IHA = inhibarea hemaglutinării

Diferențierea unor specii din genul *Candida* pe baza caracterelor biochimice

Specia	Bulion Sabouraud	Urează	Fermentarea			
			Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Lactoză
<i>C. albicans</i>	Nu se dezvoltă în suprafață	—	AG	AG	AG	—
<i>C. tropicalis</i>	Se dezvoltă în suprafață	—	AG	AG	AG	—
<i>C. pseudotropicalis</i>	Nu se dezvoltă în suprafață	—	AG	—	AG	AG
<i>C. krusei</i>	Se dezvoltă în suprafață	—	AG	—	—	—
<i>C. parapsilopsis</i>	Nu se dezvoltă în suprafață	—	A/AG	—/A	—/A	—
<i>C. guilliermondii</i>	Nu se dezvoltă în suprafață	—	—/AG	—	—/AG	—

Legendă: — = reacție negativă
 A = acidifiere
 G = producție de gaze
 / = sau

Diferențierea speciilor din genul *Cryptococcus*

Specia	Ferm. glucozei	Urează	Dezv. 37°C	Asimilare zaharuri					Asimilare nitrați
				Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Lactoză	Galactoză	
<i>C. neoformans</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	—
<i>C. albidus</i>	—	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. albidus var. diffluens</i>	—	+	—	+	+	+	—	+	+
<i>C. luteolus</i>	—	+	—	+	+	+	—	+	—
<i>C. laurentii</i>	—	+	—/+	+	+	+	+	+	—
<i>C. terreus</i>	—	+	—	+	—	—	—	+	—/+

Constante fiziologice ale animalelor de laborator

Nr. crt.	Specia	Temperatura normală	Greutatea		Longevitatea
			la fătare	adultului	
1	Șoarecele alb	37—39°C	1 g	18—20 g	3,5—4 ani
2	Șobolanul alb	38,5—39,4°	7 g	120—130 g	3—4 ani
3	Cobaiul	37,5—39,5°	40—70 g	400—900 g	3—6 ani
4	Hamsterul auriu				3—3 $\frac{1}{2}$ ani
5	Iepurele de casă	38,5—39,5° (după Marek) 39—40,8° (după Wirrh)	50 g	2,5—5 kg	7—8 ani
6	Dihorul	38,3—39,2°	10 g	1180 g	5—6 ani
7	Păsări	39,5—44° (după Marek) 40,5—42° (după Wirrh)			

Constantele sanguine la animalele de laborator (după Valeria Bica-Popii și H. Răducănescu)

Specia	Numărul de globule roșii (milioane)	Hemoglobina (grade Sahli)	Numărul de globule albe (mii)	Formula leucocitară					
				polinucleare neutrofile %	polinucleare eozinofile %	polinucleare bazofile %	limfocite mici %	limfocite mari %	monocite %
Șoarecele alb	6–10	90–97°	5–15	12–50	0,5–5,8	0,3–1	37–48,5	11–15	3–10
Șobolanul alb	4,7–12,6	93,3–100°	5–21–25,7	16–50	1–35	0,2–1	30–53,5	14–24,5	0,5–3,2
Cobaiul	4,5–6	65–95°	8–18	20–45	3–20	0,5–3	32–47	6–15	3–10
Hamsterul auriu	7,5		8–9	32	0,5–1		66		2,5
Iepurele de casă	4–6	50	8–12	30–50	1–3	0,5–3	35–60	2–9	1–4
Dihorul	8,5		8–9	65	1		33		1
Porumbelul	3,5–4,5	79–96°	7,6–16–23,4	26–41	1,5–10	2–10,6	42	13,5	3
Găina	3–4	50–65°	23–35	20–50	2–8	1–5	40–60	5–15	1–4

Constante fiziologice legate de reproducția animalelor de laborator (după Valeria Bica-Popii și H. Răducănescu)

Nr. crt.	Specia	Vârsta la care animalul este apt pentru reproducție	Durata gestației	Numărul produșilor la o fătare	Numărul fătărilor pe an	Vârsta separării puilor de mamă
1	Șoarecele alb	3 luni	19–21 zile	4–8	4–5	4 săptămâni
2	Șobolanul alb	3 luni	25–30 zile	4–8	3–4	3 săptămâni
3	Cobaiul	3–4 luni	61–67 zile	2–4	2–3	15–20 zile
4	Hamsterul auriu	3 luni	16–19 zile	4–10	3	3 săptămâni
5	Iepurele de casă	4–7 luni	30–35 zile	3–10	3–5	5 săptămâni
6	Dihorul	4–7 luni	40–42 zile	5–10	1	60 zile

Rații furajere orientative zilnice pentru animale de laborator (după Valeria Bica-Popii și H. Răducănescu)

Nr. crt.	Specia	Lapte	Plăine	Ovăz	Morcov	Lucernă	Sfeclă	Fin	Carne crudă
1	Șoarecele alb	5 g	5 g	5 g	—	—	—	—	—
2	Șobolanul alb	15 g	15 g	15 g	5 g	5 g	5 g	—	—
3	Cobaiul	—	—	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	—
4	Hamsterul auriu	5—10 g	5—10 g	10—15 g	10—20 g	—	15—20 g	10 g	—
5	Iepurele de casă	—	—	50 g	—	100—150 g	100—150 g	15—20 g	—
6	Dihorul	200—300 g	40—60 g	—	—	—	—	—	30—40 g

Receptivitatea animalelor de laborator față de unele bacterii importante pentru patologia veterinară
(după Valeria Bica-Popii și H. Răducănescu)

Specia microbiană	Specia animală	Calea de administrare	Rezultatul și durata medie a infecției
<i>Staph. pyogenes</i>	iepure	intravenoasă	1—3 zile
	șobolan tânăr	intravenoasă	24 ore — 5 zile
<i>Str. equi</i> și <i>Str. zooepidemicus</i>	șoarece	intraperitoneal	12—48 ore
<i>Escherichia coli</i>	șoarece	intraperitoneal	12—24 ore
<i>Salmonella</i>	șoarece	intraperitoneal	24—48 ore
		subcutan	3—21 zile
		per os	3—21 zile
<i>Pasteurella multocida</i>	șoarece	subcutan	24—72 ore
<i>Actinobacillus mallei</i>	cobai	intraperitoneal	5—15 zile
<i>Necrobacterium</i>	iepure	subcutan	3—6 zile
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	șoarece	subcutan	4—6 zile
	porumbel	intramuscular	3—6 zile
<i>Listeria monocytogenes</i>	cobai	intraperitoneal	3—5 zile
	iepure	conjunctival	2—3 zile (se vindecă)
<i>M. tuberculosis</i> (toate tipurile)	șoarece	intravenos	20—60 zile
<i>M. tuberculosis</i> tip uman	cobai	subcutan	30—80 zile

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- W 1. ADAMEȘTEANU I., NICOLAU A., BĂRZĂ H., 1959, „Semiologie medicală veterinară”, Ed. Academiei RSR, București.
- W 2. ADERCA I., IANCONESCU M., 1962, „Culturi de celule în inframicrobiologie”, Ed. Academiei RSR, București.
3. ANDREWES C., 1964, „Viruses of vertebrates”, Ed. Bailliere, Tindall and Cox, Londra.
- W 4. BĂIEȘ I., BRAN C., 1971, „Bolile infecțioase ale animalelor domestice”, Ed. didactică și pedagogică, București.
- W 5. BĂLBĂIE V., 1964, „Microbiologie — lucrări practice” lito Inst. Med. Farmacie, București.
- W 6. BĂRZĂ H., VINȚAN A., PAȘTEA E., CREȚEANU C., MAY I., 1955, „Curs de diagnostic clinic”, vol. III, Inst. Agr. Arad.
- W 7. BERBINSCHI C., 1968, „Boala lui Aujeszky”, Ed. Agro-Silvică, București.
8. BERGEY, 1957, „Manual of determinative bacteriology”, Ed. Bailliere, Tindall and Cox, London.
9. BOCH, J., SUPPERER R., 1971, „Veterinärmedizinische Parasitologie”, Paul Parey Verlag, Berlin.
10. BONNET H., NÉVOT A., 1964, „Travaux pratiques de bacteriologie” Ed. Masson, Paris.
11. BUTTIAUX R. ș.a., 1962, „Manuel de techniques bactériologiques”, Ed. Méd. Flammarion Paris.
- W 12. CAJAL N., 1959, „Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane” Ed. Acad. RSR, București.
- W 13. CAJAL N., 1964, „Inframicrobiologie”, in „Metodele laboratorului clinic”, Ed. medicală București, 921—1013.
14. CAMPBELL D. H., GARVEY J. S., CREMER N. E., SUSSDORF, 1963, „Methodes in Immunology”, Benjamin Inc, New York — Amsterdam.
15. CARTER G. R., 1973, „Diagnostic procedures in veterinary microbiology”, Ed. Charles C. Thomas Springfield — Illinois U.S.A.
16. CHRISTOPH H. J., MEYER H., 1968, „Klinisches laboratorium”, S. Hirzel Verlag Leipzig.
- W 17. CIUREA V., 1950, „Tehnica de microscopie” curs — lito, Med. Vet. Arad.
- V 18. DUMAS J., 1951, „Bacteriologie medicale”, Ed. Flammarion, Paris.
19. EUZEBY J., 1969, „Cours de Mycologie médicale comparée”, Vigot-Frères Editeurs, Paris.
20. GASTINEL P., 1957, „Précis de bactériologie medicale” 2-ème Edition, Ed. Masson Paris, 167—174.
21. GUIYON LE R., 1961, „Precis de bactériologie”, G. Doin et C. Editeurs Paris.
22. HANKS J. H., 1955, „Nutrition of cells in vitro”, in „An introduction to cell and tissue culture”, Burgess, Minneapolis.
23. HARRIS R. J., 1964, „Techniques in Experimental virology”, Academic Press, London — New-York.
24. HAUPT H., 1964, „Medizinisch-bakteriologische Diagnostik für Ärzte und Tierärzte”, F. ENKE Verlag Stuttgart.

25. HENNEBERG G., KÖHLER H., 1961, „Practicum der virusdiagnostik“ Fischer Verlag Stuttgart.
26. HORSFALL F. Jr., TAMM I., 1965, „Viral and Rickettsial Infections of Man“, J. P. Lippincott Company, Philadelphia — Toronto.
- W 27. IONICĂ I., CIORTEA G., MICLEA I. E., 1974, „Tuberculoza animalelor domestice“, Ed. Ceres, București.
28. LANGERON M., VANBREUSEGHEM R., 1958, „Precis de Mycologie“ G. Doin et C. Editeurs, Paris.
29. LENNETTE E. H., SCHMIDT N. J., 1964, „Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases“, 3-Ed. Amer. Publ. Hlth Ass., New-York.
30. LESBOUYRIES G., 1965, „Pathologie des oiseaux de basse-cour“ Vigot Fr. Edit., Paris.
- V 31. LICPERTA E., 1956, „Sulfamidele și antibioticele în medicina veterinară“, Ed. Agro-Silvică, București.
32. LINSERT H., SCHIMMEL D., KIELSTEIN, 1970, „Bakteriologisch-serologisches Laboratorium“, Mappe 1—2, S. Hirzel Verlag, Leipzig.
- W 33. LUNGU T., MITROIU P., 1971, „Micozele animalelor domestice“ Ed. Ceres, București.
34. MACKIE J. T., McCARTNER E. J., 1956, „Handbook of practical Bacteriology“, 9-th, Edition Livingstone, Edinburgh.
- V 35. MANOLESCU N., 1976, „Citomorfologia măduvei hematoformatoare și a leucocitoconcentratului la animale“, Ed. Ceres, București.
36. MELNICK J. L., 1956, „Tissue culture methods“ in „Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases“, Amer. Publ. Hlth., N. Y.
37. MERCHANT T. A., PACKER R. A., 1961, „Veterinary bacteriology and virology“, Ames Yowa, 63—149, 193—227, 251—669, 704—729.
- W 38. MESROBEANU L., MARX A., STAVRI D., TEODORESCU G., 1961, „Mediile de cultură în bacteriologia medicală“, Ed. medicală, București.
- W 39. MITROIU P., 1976, „Micoze și micotoxicoze la animale“, Ed. Ceres, București.
40. MORGAN J. F., MORTON H. J., PARKER R. C., 1950, „Nutrition on animal cells in tissue culture“, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 73, 1.
- V 41. MOTOC D., 1964, „Microbiologia produselor alimentare“, Ed. Tehnică, București.
- V 42. MUREȘAN E., GABOREANU M., BOGDAN A. T., BABA A. I., 1974, „Tehnici de histologie normală și patologică“, Ed. Ceres București.
43. MUSCAN S., 1974, „Biotest — Handbuch für bakteriologische Untersuchungen“, Biotest Serum Institut, Frankfurt a.M.
- W 44. NESTORESCU N., 1961, „Bacteriologie medicală“, Ed. medicală București.
- W 45. NICOLAU ST. S., 1962, „Elemente de inframicrobiologie generală“ Ed. Academiei, București.
- V 46. NICULESCU C. T., NICOARĂ S. T., 1966, „Progrese în tehnicile hematologice uzuale“, Ed. Medicală, București.
- V 47. ONET E., 1975, „Curs de diagnostic de laborator“, Lito Inst. Agronomic „Dr. P. Groza“ Cluj.
- V 48. OPRESCU C., 1963, „Infecția cu micobacterii“, Ed. Academiei București.
- V 49. PAUL I., 1976, „Morfopatologie veterinară“, Ed. Ceres, București.
- V 50. PAUL J., 1960, „Cell and Tissue culture“, 2-Edition, Edinburgh-London.
- V 51. POP AL., ISAC B., 1954, „Bruceloza umană“, Ed. medicală.
- V 52. POPA G., STĂNESCU V., 1974, „Controlul sanitar veterinar al alimentelor“, Ed. Did. și Ped., București.
- W 53. POPOVICI I., STAMATIN L., 1968, „Bolile infecțioase ale animalelor domestice“, Ed. didactică și pedagogică, București.
- V 54. PORTOCALĂ R., IONESCU N. I., 1962, „Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie“, Ed. Academiei, București.
55. PREVOT A. R., 1961, „Traité de systématique bactérienne“, Ed. Dunod, Paris.
- W 56. RĂDUCĂNESCU H., BICA-POPII VALERIA, 1973, „Bacteriologie veterinară aplicată“, Ed. Ceres, București.
57. RUJANSKA M., 1967, „Rev. med. vet.“ Pol. 10, 584—587.
58. RUSOV C., PETROVIC P., 1968, „Vet. glasnik“.
59. SCHALM O. W., JAIN N. C., CARROL E. J., 1975, „Veterinary Haematology“, 3-rd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia.
- W 60. STAMATIN N., 1965, „Microbiologie și imunologie veterinară“ Ed. didactică și pedagogică, București.
61. STARKE G., 1968, „Virologische Praxis“, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.



62. STOENESCU V., NICULESCU A., 1964, „Bolile păsărilor“, Ed. Agro-Silvică, București.
63. TOPLEY — WILSON, 1957, „Principles of bacteriology and immunity“, Fourth edition, Edward and Arnold Ed., London.
64. VIOR C., 1962, „Tuberculoza aviară“, Ed. Agro-Silvică București.
65. WILDFUHR G., 1959, „Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie“, Ed. G. Thieme, Leipzig, 258—280.
66. WILLMER E. N., 1958, „Tissue culture“, Wiley, New-York.
67. WINKLE S., 1955, „Mikrobiologische und serologische Diagnostik“, 2 Aufl. Fischer Verlag, Stuttgart.
68. WHITBY L., HYNES M., 1956, „Medical Bacteriology“, 6-th Ed. Churchill, London.
69. WODROW J. C., 1974, Hematologia, Budapesta.
70. SHILADZE I., 1968, Veterinaria, 3, 27—30.
71. *** 1967, „O.M.S. WHO/TB Techn. Guide, 7,22.
72. *** „Diagnostic microscopique des maladies tropicales“ broșură BAYER.
73. *** 1972, „Handbuch der Oxoid-Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke, London.
74. *** 1953, „Difco Manual of dehydrated culture media and clinical laboratory procedures, 9-th Edition, Detroit — Michigan.
75. *** „Handbook of Microbiology, Dehydrated Culture Media, Culture Medium Bases, Sundry Preparations for Microbiology“, E. Merk, Darmstadt.
76. *** „Série de Rapports Techniques, Nr. 210: standardisation des tests de sensibilité bactérienne (Deuxième rapport du comité d'experts des antibiotiques OMS), Genève.
77. *** Instrucțiuni tehnice în serodiagnosticul brucelozei la animale, 1971, Ministerul Agriculturii și Silviculturii.
78. *** 1974 „Haury-Test Fortschritt und Erfahrung aus München, Vierte Ausgabe.
79. *** Instrucțiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino“ pentru întrebuințarea serurilor aglutinante antisalmonella.
80. *** 1967, Bull. Un. Int. Tub., 39, 17.
81. *** 1962, Bilan Int. Tub., 32, 1, 31.



Redactor: Dr. med. vet. DESPINA TUDOR
Tehnoredactor: MARIA IONESCU

Bun de tipar: 29.08.1978. Apărut: 1978. Tiraj: 3.350 ex.
Coli editoriale: 25,05. Coli de tipar: 21,50. C. Z. pen-
tru bibliotecile mari: 636.089 C.Z. pentru bibliotecile
mici: 636.

Întreprinderea Poligrafică Cluj
Municipiul Cluj-Napoca, str. Brassai nr. 5—7.
Republica Socialistă România
Comanda nr. 335/1978

